



Universidad
Carlos III de Madrid

Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales e
Ingeniería Química

PROYECTO FIN DE CARRERA

IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE MATERIALES

Autor: Miriam Inmaculada Gordillo Sánchez

Tutor en la Universidad: Francisco Javier Velasco López
Tutor en Repsol: Juan Miguel Jiménez Mateos

Leganés, junio de 2014



**Título: IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE MICROSCOPIA
CONFOCAL DE MATERIALES**

Autor: Miriam Inmaculada Gordillo Sánchez

Director por la Universidad: Francisco Javier Velasco López

Director por Repsol: Juan Miguel Jiménez Mateos

EL TRIBUNAL

Presidente: _____

Vocal: _____

Secretario: _____

Realizado el acto de defensa y lectura del Proyecto Fin de Carrera el día 25 de Junio de 2014 en Leganés, en la Escuela Politécnica Superior de la Universidad Carlos III de Madrid, acuerda otorgarle la CALIFICACIÓN de

VOCAL

SECRETARIO

PRESIDENTE

Agradecimientos

Pensé que no llegaría nunca este día, pero finalmente llegó, y es este trabajo el que pondrá punto y final a una etapa de mi vida, que no podría haber llevado a cabo sin el apoyo de muchas personas, a las que quiero aprovechar para mencionar en las siguientes líneas.

Agradezco a Juan Miguel Jiménez y a Francisco Velasco, directores de este proyecto, por la gran oportunidad que me dieron y por la confianza que depositaron en mí. Por mi parte, ha sido un verdadero placer trabajar con ellos y agradezco enormemente todo lo que me han enseñado y el trato y la paciencia que me han dedicado.

También agradezco a Irene y a Montse, por todo lo que me han enseñado dentro y fuera del laboratorio.

A mis padres, que han trabajado mucho para que tanto mi hermana como yo pudiéramos estudiar, dándonos siempre todo. Gracias también por sentir mis triunfos como suyos.

A mi hermana Marina, que a pesar de ser más pequeña he acabado preguntándole dudas de alguna asignatura. Gracias por hacerme reír, por tu ayuda y complicidad.

A mis tías, que a pesar de que están lejos, siempre las he sentido muy cerca, ya que siempre han estado ahí, detrás del teléfono cuando lo he necesitado.

A mis suegros y cuñados, que son para mí como padres y hermanos y siempre me han animado y tranquilizado en los peores momentos, subiéndome mucho el ánimo.

A mi gran amiga y persona Alba, con la que he compartido muchos buenos momentos y siempre ha estado ahí.

Y por supuesto, a mi novio, Carlos, gracias por el apoyo que me has dado siempre y por la confianza que siempre has tenido en mí, incluso cuando a mí misma me faltaba un poco. Gracias por tu paciencia para explicarme las cosas antes de los exámenes, que más de una vez, han hecho que aprobara. Gracias por estar siempre ahí, cuando he reído y cuando he llorado, gracias por tus consejos y sinceridad en todo momento.

Finalmente quiero expresar mi gratitud a Repsol y al personal del Centro Tecnológico de Repsol (CTR) por permitirme disponer de sus instalaciones y equipos, para poder desarrollar este proyecto.

Parte de que haya llegado este momento, y por tanto, de mi título ha sido gracias a todos vosotros, muchas gracias a todos.

Resumen

La microscopía confocal es una técnica basada en la observación de un único plano focal, con un aporte mínimo de señal por el resto de los planos iluminados. Nació a mediados del siglo XX, pero hasta muy recientemente no ha encontrado su lugar como técnica de observación y medición en otros campos, distintos de los que le venían siendo habituales (biomédicos).

En 2013 se adquiere e implementa un sistema de microscopía confocal, formado por dos equipos de Leica (DCM 3D y TCS-SP8) en el Centro Tecnológico de Repsol, el cual no sólo permitirá observar y medir con precisión observables a los que antes era difícil acceder, sino que permitirá realizar nuevas tareas y descargar de trabajo algunas técnicas que tradicionalmente venían estando saturadas, como por ejemplo, el microscopio electrónico de barrido.

Con este proyecto, se pretende describir el proceso de implementación de los equipos, así como ilustrar para qué usarlos y qué puede esperarse de ellos en cuanto a aplicaciones. También se describirá todo el trabajo realizado para la puesta a punto de métodos e informes con los que cubrir diferentes necesidades del Centro Tecnológico de Repsol.

Palabras clave: Microscopía Confocal, aplicaciones, Centro Tecnológico de Repsol.

Abstract

Confocal microscopy is a technique based on the observation of a single focal plane with a minimal input signal from the rest of the enlightened planes. Created in the mind-20th century, it was not until recent years when this technique found its place as an observation and measurement technique in fields, others than those in which its use was widely spread (biomedical).

In 2013, the Repsol Technology Centre acquires and implements a confocal microscopy system, consisting of two Leica's hardware (DCM 3D and TCS-SP8). This initiative will not only allow to observe and measure with great accuracy, observables whose examination were difficult with previous approaches, but also to perform new tasks and relieve some techniques traditionally saturated, as for example, the scanning electron microscope.

This project aims to describe the implementation process of the equipment as well as to illustrate how to use them and what can be expected of them in terms of applications. All the work done for the development of methods and reports that cover different Repsol Technology Centre needs are also described.

Keywords: Confocal Microscopy, applications, Repsol Technology Centre.

Índice general

Introducción y objetivos.....	12
1.1 Introducción.....	12
1.2 Objetivos	13
1.3 Estructura de la memoria.....	13
Microscopía Confocal.....	15
2.1 Introducción.....	15
2.2 Principio Físico	16
2.3 Ventajas de la Microscopía Confocal	18
Procedimiento de Selección y Compra de los Equipos.....	19
Adecuación del Laboratorio	24
4.1 Planos del laboratorio de microscopía.....	24
4.2 Equipos anteriormente instalados en el laboratorio de microscopía.....	24
4.3 Modificaciones y estado final del laboratorio de microscopía	25
Instalación de los Equipos.....	26
5.1 Sistema de microscopía confocal para materiales Leica DCM 3D	26
5.1.1 Descripción del Equipo.....	26
5.1.2 Componentes.....	28
5.1.3 Condiciones de instalación	30
5.1.4 Software LeicaSCAN.....	33
5.1.5 Software Leica MAP.....	35
5.2 Sistema de microscopía confocal espectral TCS-SP8 con microscopio invertido	
DMI6000CS.....	37
5.2.1 Descripción del equipo	37
5.2.2 Componentes.....	38
5.2.3 Condiciones de instalación	45
5.2.4 Software LAS AF.....	47

Aplicaciones desarrolladas en la Dirección de Tecnología de Repsol.....	50
6.1 Introducción.....	50
6.2 Aplicaciones del Sistema de microscopía confocal para materiales Leica DCM 3D....	53
6.2.1 Medición de huellas de ensayo HFRR en rodamientos	53
6.2.2 Medición de huellas de cojinetes de biela debidas al efecto de la cavitación.....	61
6.2.3 Medición de distancia entre capas en polímeros multicapa.	69
6.2.4 Otras aplicaciones con el DCM 3D	70
6.3 Aplicaciones del Sistema de microscopía confocal espectral TCS-SP8 con microscopio invertido DMI6000CS	75
6.3.1 Inclusiones Fluidas.....	75
6.3.2 Polímeros multicapa.....	76
6.3.3 Otras aplicaciones con el TCS-SP8	79
Conclusiones	81
Anexo	83
8.1 Definiciones básicas.....	83
8.2 Planos del laboratorio de microscopía.....	88
Referencias	92
Otra Bibliografía consultada	93

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del principio de la microscopía confocal.	17
Figura 2. Fotografía del DCM 3D.....	27
Figura 3. Vistas acotadas del equipo DCM 3D (todas las dimensiones en milímetros) ...	31
Figura 4. Configuración general del microscopio DCM 3D.....	32
Figura 5. Pantalla de adquisición del microscopio.....	33
Figura 6. Pantalla de visualización del microscopio.	34
Figura 7. Pantalla de configuración del microscopio.....	34
Figura 8. Pantalla del software Leica Map. 1-visor de páginas, 2-documento, 3-lista de estudiables, 4-estudiables, 5-menú operadores, 6-menú estudios, 7-ilustraciones, 8- recuadro. (Leica Microsystems).....	35
Figura 9. Fotografía del sistema de microscopía TCS SP8 con microscopio invertido DMI6000CS.	37
Figura 10. Principio de trabajo de varios fotodetectores: fotomultiplicadores (izquierda) y detectores híbridos (derecha).	40
Figura 11. Dimensiones y espacio requerido por el microscopio.	46
Figura 12. Pantalla de configuración del software LAS AF.	48
Figura 13. Pantalla de adquisición del software LAS AF.	48
Figura 14. Pantalla de procesamiento de imágenes del software LAS AF.	49
Figura 15. Pantalla de cuantificación del software LAS AF.....	49
Figura 16. Ejemplo de dispositivo con movimiento alternativo de alta frecuencia. 1- Recipiente del fluido, 2-Bola de ensayo, 3-Masa de ensayo, 4-Placa de ensayo, 5- Baño de calentamiento, 6-Movimiento alternativo.	53
Figura 17. Condiciones del aire en el laboratorio.	54
Figura 18. Ejemplo de una huella de desgaste con un contorno borroso. 1-Bola de ensayo (no está escalada), 2-Zona no rozada, 3-Zona rozada menos nítida, 4-Zona rozada.55	
Figura 19. Imagen de la capa topográfica nivelada (izquierda) y de la capa de la imagen (derecha).....	57

Figura 20. Imagen topográfica con escala de alturas en pseudocolor (izquierda). Imagen topográfica con supresión de forma (derecha).	57
Figura 21. Medidas de alturas en el perfil del diámetro menor de la huella del rodamiento.	58
Figura 22. Medidas de áreas en el perfil del diámetro menor de la huella del rodamiento	58
Figura 23. Volumen de la huella.	59
Figura 24. Componentes de una biela.	61
Figura 25. Representación esquemática del fenómeno de nucleación y colapso de microburbujas y la emisión de ondas de choque.	62
Figura 26. Fotografía de las diferentes huellas producidas en los cojinetes, en función de la holgura.	63
Figura 27. Imagen de la capa topográfica nivelada (izquierda) y de la capa de la imagen (derecha), realizadas ambas con un objetivo de 20x.	65
Figura 28. Imagen topográfica con escala de alturas en pseudocolor (izquierda). Imagen topográfica con supresión de forma (derecha). Realizadas ambas con un objetivo de 20x.	65
Figura 29. Medidas de alturas en un perfil de la huella del cojinete.	66
Figura 30. Medidas de áreas en un perfil de la huella del cojinete.	66
Figura 31. Volumen de una de la huellas del cojinete realizada con un objetivo de 20x.	67
Figura 32. Imagen de la huella completa de un cojinte, realizada con un objetivo de 10x, en la que se mide el volumen de una de las huellas laterales.	67
Figura 33. Perfil del espesor de un polímero bicapa (PE-PA).	69
Figura 34. Perfil del espesor de las capas en un polímero bicapa (PE-PA).	70
Figura 35. Imagen de inyectores diesel	70
Figura 36. Superficie de la cabeza de un inyector de diesel en pseudocolor (izquierda) y con supresión de forma (derecha).	71
Figura 37. Altura máxima y media de un orificio de un inyector diesel usado	71
Figura 38. Área de un orificio de un inyector diesel usado.	72
Figura 39. Volumen de un orificio de un inyector diesel usado.	72
Figura 40. Junta de teflón y carbono (tipo gráfita y fibra de carbono)	73
Figura 41. Superficie de la junta sin usar	74
Figura 42. Superficie de la junta usada	74
Figura 43. Inclusión fluida observada con un microscopio óptico convencional.	75
Figura 44. Inclusión fluida en tres dimensiones.	76
Figura 45. Imágenes de cortes en plano YZ de polímeros multicapa.	77
Figura 46. Vista del recubrimiento realizado a un polímero.	78
Figura 47. Imágenes de las nanopartículas tomadas con microscopía confocal por reflexión.	79
Figura 48. Imágenes de la fluorescencia de las fibras de papel.	80
Figura 49. Esquema del funcionamiento de una lente convergente.	86
Figura 50. Plano de las medidas generales del laboratorio de microscopía.	89
Figura 51. Plano del laboratorio de microscopía, especificando las medidas del mobiliario.	90
Figura 52. Plano del laboratorio de microscopía especificando la colocación de los equipos disponibles en la sala.	91

Índice de tablas

Tabla I. Características técnicas del perfilómetro ofertadas por Olympus, Leica y Zeiss.	20
Tabla II. Características técnicas del equipo másico ofertadas por Olympus, Leica y Zeiss.	21
Tabla III. Soporte técnico y coste de los equipos.....	22
Tabla IV. Comparativa de los proveedores.....	22
Tabla V. Condiciones de operación del DCM 3D	30
Tabla VI. Láseres del TCS SP8.....	43
Tabla VII. Objetivos del microscopio.	44
Tabla VIII. Condiciones ambientales de funcionamiento.....	45
Tabla IX. Dimensiones y espacio requerido.	45
Tabla X. Condiciones de vibración máximas aceptables.....	46
Tabla XI. Especificaciones eléctricas.....	47
Tabla XII. Condiciones del ensayo.	54

Índice de ecuaciones

Ecuacion 1. Límite de resolución.....	81
Ecuación 2. Magnificación.....	109
Ecuación 3. Distancia focal.....	110
Ecuación 4. Apertura numérica.....	110
Ecuación 5. Límite de resolución.....	111
Ecuación 6. Profundidad de campo.....	112

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1.1 Introducción

El presente proyecto nace de la idea del departamento de Tecnologías Analíticas (TTAA) de la Dirección de Tecnología de Repsol, de adquirir un sistema de microscopía confocal capaz de satisfacer nuevos requisitos planteados en diferentes áreas, tales como el Laboratorio de Motores y Lubricantes, Geología, Combustibles y Refino, Polímeros, etc.

Los nuevos requisitos que se plantean son tan diversos como las áreas donde son requeridos, siendo algunos de ellos, la observación del interior de materiales transparentes de forma no invasiva, sin contacto, y con una mínima interacción (la luz), la obtención de medidas muy precisas en las tres dimensiones espaciales, el cálculo de áreas y volúmenes e incluso la reconstrucción de la superficie en tres dimensiones

Esta nueva técnica, rápida, flexible y robusta, también plantea ventajas, como la posibilidad de observar la muestra en color real.

Por todo ello, la microscopía confocal supone una mejora sobre otras técnicas, como la Perfilometría de contacto, el Microscopio Electrónico de Barrido (*SEM*) y la Microscopía óptica convencional.

1.2 Objetivos

El objetivo fundamental del Proyecto consiste en la implementación de un sistema de microscopía confocal, que cuenta con dos microscopios (DCM 3D y TCS-SP8), ambos de Leica) en el Centro Tecnológico de Repsol (CTR), y el desarrollo de métodos para la observación y el estudio de muestras procedentes de los proyectos de I+D+i en curso, así como de los Laboratorios de Asistencia Técnica de las diversas Empresas del Grupo.

Los estudios provenientes del Laboratorio de Motores, donde se desarrollan los combustibles y lubricantes de última generación de Repsol, tanto comerciales como de competición, recibirán en este Proyecto una atención particular.

Además del objetivo principal, este Proyecto también recoge una serie de objetivos personales que van implícitos en la consecución del mismo:

- Adquirir una visión global del funcionamiento de una empresa multinacional, en la que los diferentes departamentos están íntimamente relacionados, particularmente su área de I + D + i.
- Ampliar los conocimientos teóricos adquiridos en la Universidad, así como la adquisición de conocimientos prácticos acerca de distintas tecnologías.

1.3 Estructura de la memoria

Este documento se puede dividir en cinco bloques principales:

1. El primer bloque comprende los capítulos uno y dos, en los cuales, por un lado, se realiza una introducción de los contenidos y objetivos del proyecto, y por otro, se describen los conceptos principales de la microscopía confocal, así como sus ventajas más características.
2. El segundo bloque muestra el procedimiento de compra que se llevó a cabo en el caso de los equipos de los que trata el proyecto.
3. La tercera parte, se corresponde con los capítulos cuatro y cinco, en los que se desarrollan los procedimientos que se llevaron a cabo para adecuar el laboratorio del Centro Tecnológico de Repsol, en el cual se iban a colocar los nuevos equipos. En este bloque también se describen los equipos detalladamente (hardware y software).

4. En el cuarto bloque (capítulo 6) se describen algunas de las aplicaciones desarrolladas en los equipos para dar servicio a diferentes áreas del Centro Tecnológico de Repsol.
5. En el quinto y último bloque, se presentantan las conclusiones del proyecto, además de un anexo donde pueden encontrarse definiciones que serán de ayuda en la lectura y entendimiento del proyecto.

Capítulo 2

Microscopía Confocal

2.1 Introducción

El concepto de microscopía confocal fue patentado en 1957, por Marvin Minsky, matemático estadounidense, siendo introducidos los primeros microscopios en 1968 por Petran y colaboradores. Sin embargo, su gran aceptación y espectacular desarrollo ha ido de la mano del avance de los láseres y equipos de cómputo.

La microscopía confocal es una nueva técnica de observación, que está logrando excelentes resultados en diversas ramas de la Ciencia, no sólo en el campo biomédico (Medicina, Biología y sus ramas), que es donde la técnica nace, sino también para las que hasta ahora eran ajenas, tales como las Ciencias relacionadas con los materiales (Física y Química de Estado Sólido, Ingeniería de Materiales, Electrónica, Mecánica, Geología, Tribología y muchas más). Su éxito se debe a las indudables ventajas que ofrece frente a la microscopía óptica tradicional (imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal, etc) y sobre todo a la posibilidad de obtener “secciones ópticas” de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional de forma no invasiva.

La mayor parte de las muestras observadas con microscopía óptica, son translúcidas, o en el caso de ser opacas, su superficie de reflexión no es fácil que llegue a estar perfectamente pulida. En ambos casos, la luz interacciona con la muestra a varias profundidades, por lo que la imagen que llega al observador presenta áreas borrosas

debidas a la luz procedente de zonas fuera del plano de enfoque, lo que produce una degradación en el contraste y resolución de la imagen. Por otra parte, en la microscopía de fluorescencia convencional, el espécimen entero está sobresaturado de luz a partir de la fuente de iluminación. Debido a la conservación de la intensidad de la luz en su recorrido, todas las partes del espécimen a lo largo de su ruta óptica serán excitadas y la fluorescencia detectada por un fotomultiplicador o una cámara.

El principio de la microscopía confocal se basa en utilizar una iluminación puntual y en la eliminación de la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco por medio de una apertura o diafragma, (*pinhole*, en el argot habitual de este campo).

Dado que sólo se ilumina una pequeña zona de la muestra, casi puntual, para poder visualizarla se necesita un sistema de barrido que permita muestrear todos los puntos, *pixeles*, de la zona a observar, y un sistema de formación de la imagen donde se recoja la información de cada uno de estos puntos y reconstruya la imagen.

Este tipo de microscopio confocal en el que el haz del laser barre la muestra es denominado *Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*. Debido a que el laser necesita un tiempo para barrer la imagen, ésta no puede ser visualizada de manera instantánea.

El microscopio confocal trabaja con muestras que al incidir la luz sobre ellas, reflejan toda o parte de la luz incidente (microscopía de reflexión), o emiten luz en una longitud de onda superior (microscopía de fluorescencia). El primer caso se suele utilizar con muestras opacas, principalmente en estudios de materiales, mientras que la fluorescencia, hasta ahora, se utiliza principalmente con muestras biológicas.

2.2 Principio Físico

El funcionamiento básico del microscopio confocal puede observarse en la Figura 1. Parte de la luz procedente de la fuente de iluminación, atraviesa una primera apertura y es reflejada mediante un espejo dicróico (refleja la parte del espectro necesaria para la excitación, transmitiendo el resto), y se enfoca en un punto del espécimen mediante la lente de un objetivo. La señal emitida por el punto iluminado (fluorescencia o luz reflejada) vuelve por el mismo camino óptico, pasa de nuevo a través del espejo dicróico y es enfocada en un detector o fotomultiplicador. Una segunda apertura es colocada delante del detector para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco (por encima del foco o por debajo de él).

La base para describir un microscopio confocal es la existencia de dos pinholes, uno entre la fuente de luz y el objetivo, y el otro entre el objetivo y el detector. Ambos pinholes deben estar perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos, únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal. La utilización de un láser como fuente de luz permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad. La luz reflejada, o fluorescencia emitida por la muestra es recogida en un detector, donde se transforma en una señal de vídeo que se digitaliza y almacena en un ordenador, visualizándose a través de un monitor. La mayoría de los sistemas cuentan con varios detectores y un sistema óptico, que permite recoger en cada uno de ellos diferentes longitudes de onda.

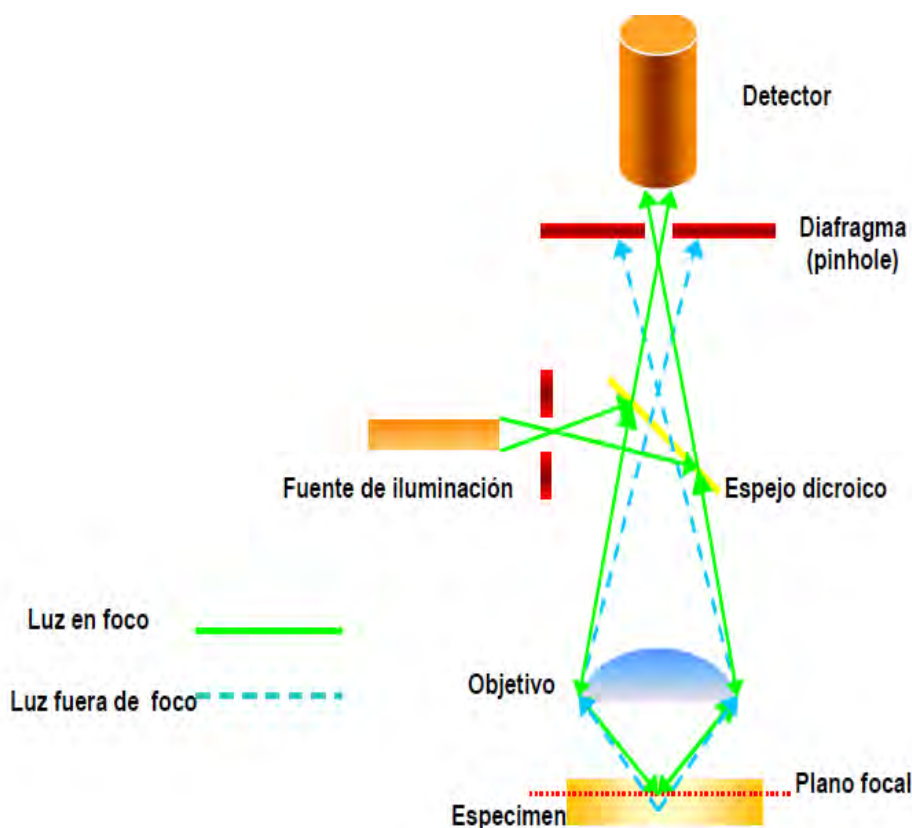


Figura 1. Esquema del principio de la microscopía confocal.
(microscopía laser confocal)

2.3 Ventajas de la Microscopía Confocal

Las principales ventajas de la microscopia confocal frente a la microscopia óptica tradicional son las siguientes:

- Mayor resolución: descrito en el apartado 8.1 (Anexo: Definiciones Básicas).
- Mayor contraste: debido a que se elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco.
- Posibilidad de realizar secciones ópticas: Variando el plano de enfoque, el sistema es capaz de tomar imágenes a diferente profundidad, lo que permite obtener información tridimensional de la muestra, que además llega a ser cuantitativa.
- Reconstrucción 3D. A partir de las secciones ópticas es posible aplicar técnicas de reconstrucción 3D que nos permitan visualizar estructuras tridimensionales, además de poder calcular y medir no sólo longitudes y áreas en el plano XY sino también áreas en el espacio tridimensional y volúmenes. Además, es posible programar el equipo para obtener imágenes durante un periodo de tiempo determinado.
- Imágenes Lambda. Si el equipo cuenta con un detector espectral podremos tomar imágenes a diferentes longitudes de onda (“lambda scan”) y a partir de ellas, deducir el espectro de emisión o fluorescencia de un objeto, incluso bajo excitación de varias longitudes de onda.

El sistema de barrido punto a punto (*scan*) utilizado en los microscopios confocales de tipo CLSM, comporta una serie de ventajas adicionales como son:

- Posibilidad de obtener imágenes perpendiculares al plano XY tomando la misma línea a diferentes profundidades.
- Fijar el láser sobre un punto o una pequeña zona de la muestra y tomar imágenes a diferentes tiempos para observar los efectos del láser sobre esa zona.
- Aumentar la resolución mediante zoom del área a barrer tomando mayor número de puntos en áreas más pequeñas.

La velocidad de formación de la imagen depende, por tanto, del número de puntos que tomemos por imagen (resolución), así como del tiempo que se dedique a registrar la señal proveniente de cada punto (tiempo de residencia o “*dwelling time*”).

Capítulo 3

Procedimiento de Selección y Compra de los Equipos

Debido a las nuevas necesidades existentes en la Dirección de Tecnología de Repsol, se decide implementar un laboratorio de microscopía confocal en el Centro Tecnológico de Repsol (CTR).

Para evaluar diferentes opciones, se solicitan ofertas a diferentes proveedores. Los elegidos son: Olympus, Leica, Zeiss e Izasa (representante de Nikon en España), a los cuales se les demandará la presentación de una oferta técnica además de una demostración en el CTR. Izasa no presenta propuesta, por lo que es descartada directamente.

El departamento de Tecnologías Analíticas de la Dirección de Tecnología de Repsol estudia y valora los equipos de los diferentes proveedores, teniendo en cuenta las características técnicas, las prestaciones y el servicio post-venta.

Una vez propuestas unas recomendaciones técnicas, el Departamento de Compras, teniendo en cuenta las observaciones de Tecnologías Analíticas, negocia las propuestas con los proveedores, teniendo en cuenta el precio, y termina por designar un proveedor.

En la tabla I y tabla II se muestra la comparación de las características técnicas de los equipos de los tres proveedores considerados, primero para el perfilómetro y después para el equipo másico (confocal “clásico”).

En la tabla III se muestran otras características de interés, tales como la formación y el soporte técnico prestado por los diferentes proveedores.

Componente	Concepto	Olympus	Leica	Zeiss
"perfilómetro" (superficies)				
	iluminación	laser 405	LED B + LED 460	Xe
	campo oscuro	no	sí	
	alta resol. (px)	4000x4000		1280x1024
	barrido	sí	no	multirendija
	partes móviles	sí	no	sí
	sist. antivibr.	sí	no	sí
	dimen. Pletina (cm)	30 X 30	15,4 X 15,4	15 x 15
	carga máx. (kg)	10	20	6
	espacio trabajo vertical máx (cm)	4	28	6,3
	rango de trabajo en z (cm)	1	4	1,5
	resol. máx z (nm)	10	< 2	
	objetivos (NA;WD)			
		2,5 0,08 - 10,7 PLAN		
		2,5 0,08 - 10,7 PLAN		
		5 0,15 - 20 PLAN	0,15 - 12 PLAN	0,13 -14,5 EPIPLAN
		5 0,15 - 20 PLAN		
		10 0,3 - 11 PLAN	0,3 -11 PLAN	0,25 -9,3 EPIP-NEOF
		10 0,3 - 11 PLAN		
		20 0,4 -12 PLAN	0,5 - 1,27 PLAN	0,22 - 12,1 EPIP-NEOF
		20 0,6 - 1 PLANAPO		0,5 - 2,1 EPIP-NEOF
		50 0,5 - 10,6 PLAN	0,55 - 8 PLAN	0,95 - 0,27 EPIP-APO
		50 0,95 - 0,35 PLANAPO		
		100 0,95 - 0,35 PLANAPO		
		100 0,8 - 3,4 PLAN		
		150 0,95 - 0,25 PLAN APO		0,95 - 0,23 EPIP-APO
	resol. vertical (um)	0,01	0,001	
	repetibilidad hor. %	0,5	1	0,2
	repetibilidad ver. %	0,1	1,2	1,1
	exactitud (1 um) %	0,2	1,2	
	film multicapa	sí	no	sí
	revolver adicional	sí	no	

Tabla I. Características técnicas del perfilómetro ofertadas por Olympus, Leica y Zeiss.

El equipo ofertado por Leica ofrece la posibilidad de ver la superficie en campo oscuro, aplicación muy útil ya que gran parte del espécimen queda a oscuras, mientras que las partículas, se ven brillantes por la luz que reciben y dispersan en todas las direcciones, pudiendo diferenciarlas fácilmente.

Otra de las ventajas que ofrece Leica es una robusta platina, capaz de soportar piezas pesadas (hasta 20 kg) y de grandes dimensiones, ya que el cabezal es móvil.

Además de esto, la resolución del equipo ofertado por Leica, es mejor que la de los equipos de las otras casas.

Másico	Concepto	Olympus	Leica	Zeiss
	platina	108 x 69	127 x 83	130 x 130
	resolución máxima	resolución máxima	resolución máxima	resolución máxima
	unidad espectral	red difrac galva + filtros	prismas secuenciales	
	canales		1 HyD fluor.	array GaAsP
		3 PMT fluor.	1 PMT fluor.	1 PMT
		1 PMT trans.	1 PMT trans.	1 PMT
	iluminación fluorescencia	Hg	metal haluro	Hg
	iluminación transmitida	halógeno	halógeno	halógeno
	cámara	CCD 1X1,8" 2 Mpx		
	Nomarski	sí		
	objetivos	4	0,13 - 17 PLAN	
		5	0,15 - 13,7 PLAN	
		10	0,3 - 10 PLAN	0,45 - 2,1 PLAN APO
		20	0,45 - 7,6 PLAN corrección ajustable	0,7 - 2,4 PLAN APO seco
		20	0,75 - 0,6 PLAN APO inm mult	0,8 - 0,55 PLAN APO
		40	1,3 - 0,2 PLAN	1,3 - 0,2 PLAN APO inm
		60	0,7 - 2,2 PLAN corrección ajustable	
		60	1,42 - 0,15 PLAN APO inmersión aceite	
		63	1,4 - 0,14 PLAN APO (inner. aceite)	1,4 - 0,19 PLAN APO inm
	puertos láser	3	4	4
	láseres	405	diodo 50 mW	diodo 30 mW
		473	diodo 15 mW	
		458		
		488	ES 20 mW	
		514		
		552	ES 20 mW	Ar 25 mW
		561		diodo 20 mW
		633		HeNe 5 mW
		635	diodo 20 mW	
		638	ES 20 mW	

Tabla II. Características técnicas del equipo másico ofertadas por Olympus, Leica y Zeiss.

En este caso, se puede observar que la resolución del equipo de Leica es bastante mejor, además la oferta de objetivos de que dispone tienen mejores aperturas numéricas que los que ofrece Olympus y muy similares a las de Zeiss.

En la tabla III se puede observar que Leica tiene más técnicos a disposición del cliente que Olympus y ofrece más horas de formación que Zeiss.

Soporte		Olympus	Leica	Zeiss
	técnicos	2 (Barna, Oporto)	4 (1 Mad, Alicante, 2 Barna)	4
	especialistas	1	5	3
formación (h)		80	48	32

Tabla III. Soporte técnico de los equipos

Tras observar las características técnicas de los equipos se realiza una valoración de los proveedores, en base al precio, el equipo más moderno, el proveedor con mejor infraestructura de servicio al cliente y las características técnicas de los equipos, teniendo en cuenta cuáles son los mejor optimizados para cumplir las necesidades del CTR. En la tabla IV, se muestran los resultados de la comparativa, obteniendo Leica los mejores resultados.

Condiciones técnicas incluidas en la petición de ofertas	Olympus	Leica	Zeiss
Perfilómetro altura muestra > 10 cm	NO	SI	SI
Perfilómetro luz monocromática	SI	SI	NO
Perfilómetro muestras gran tamaño	NO	SI	NO
Perfilómetro cabezal desmontable	SI	SI	NO
Perfilómetro objetivos interferométr.	NO	SI	NO
Micro. conv. detec. alta sensibilidad	NO	SI	SI
Micro. conv. con sist. analit. espectral	NO	SI	SI
Calificación técnica: VÁLIDO / NO VÁLIDO	NO VÁLIDO	VÁLIDO	NO VÁLIDO

Tabla IV. Comparativa de los proveedores

Tecnologías Analíticas envía la valoración realizada al Departamento de Compras, a considerar junto con la oferta económica de los proveedores. Este departamento, inicia una negociación con el proveedor preferido (en este caso Leica), en la que se tratan diferentes puntos, tales como:

- Añadir accesorios al equipo solicitado por el usuario, que no estaban incluidos en las ofertas iniciales recibidas. De esta forma se consigue equipar el laboratorio con un sistema de mejores prestaciones.
- Aprovechar la negociación para bajar precio en otras dos solicitudes de pedido generadas por otras áreas de Tecnología, y que se pretenden adquirir también a Leica.

Tras esta negociación con Leica, se acuerda la compra de los dos equipos confocales (DCM 3D y TCS-SP8), en cuyo presupuesto se incluyen una platina galvanométrica (*Galvo stage*) para el TCS-SP8 y un objetivo confocal (150 x) para el DCM 3D.

Capítulo 4

Adecuación del Laboratorio

4.1 Planos del laboratorio de microscopía

La sala de microscopía del CTR (laboratorio 08), presenta una estructura rectangular de 9,9 metros de largo y 3,2 metros de ancho. Se presentan los planos de dicha sala en el apartado 8.2 (Anexo: Planos de la habitación de microscopía).

4.2 Equipos anteriormente instalados en el laboratorio de microscopía

Antes de la compra de los nuevos equipos, se disponía de:

- Microscopio óptico de luz transmitida, incluyendo contraste interferencial diferencial, Leica DM6000B, utilizado con muestras muy delgadas.

- Microscopio de reflexión y luz polarizada (metalográfico), Leitz-Leica DM RXP, usado especialmente para observación de muestras por reflexión.
- Microtomo (Reichert -actualmente Leica- Ultracuts): es un instrumento de corte que permite obtener cortes muy finos (nanométricos) de un material, conocidos como secciones. Este tipo de equipos es importante en la microscopía ya que permite la preparación de muestras para ser observadas en microscopios de transmisión ópticos y electrónicos.
- Lupa binocular (Leica MZ APO): usada para la observación estereoscópica de objetos tridimensionales.
- Microscopio Electrónico de Barrido (FEI Quanta Feg 650): permite una mayor magnificación, y en función del detector utilizado, se pueden obtener distintos tipos de imagen (de electrones secundarios o retrodispersados). Además permite realizar análisis elemental mediante la técnica EDS y análisis topográfico (empleado para observar superficies constituidas por pequeños relieves, depresiones, grietas y prominencias). También cuenta con un sistema de catodoluminiscencia.
- Metalizador: equipo que permite la deposición de capas conductoras finas y uniformes, por ejemplo, por impacto sobre una lámina metálica (usualmente oro) por parte de un plasma de Ar (*sputtering*), con objeto de hacer conductora electrónicamente la superficie de las muestras a observar por SEM, evitando aberraciones debidas a efectos de carga en superficie y permitiendo mayor calidad, resolución y magnificación.

4.3 Modificaciones y estado final del laboratorio de microscopía

La instalación de los nuevos equipos de Leica requería ciertos requisitos de espacio, por lo que hubo que reorganizar la habitación. Se reubicaron varios equipos para disponer de más espacio, y además se donó el metalizador a la Universidad Rey Juan Carlos, debido a su obsolescencia. En el plano 3 del Anexo (Punto 8.2: Planos de la habitación de microscopía) puede verse la disposición final de la sala con todos los equipos reubicados.

Capítulo 5

Instalación de los Equipos

5.1 Sistema de microscopía confocal para materiales Leica DCM 3D

5.1.1 Descripción del Equipo

En el campo de la metrología sin contacto de superficies, existía en los últimos años, una ardua competencia entre los interferómetros y los perfilómetros confocales, a pesar de que ambas tecnologías permiten realizar mediciones topográficas precisas y fiables en un rango que empieza por los milímetros y llega hasta los nanómetros.

El DCM 3D de Leica es un perfilómetro tridimensional, basado en la adquisición de imágenes confocales, es decir, permite la visualización tridimensional y la medición sin contacto de superficies en tres dimensiones, siendo capaz de ofrecer en un solo equipo, un microscopio en color para aplicaciones de campo claro y campo oscuro, un sistema de adquisición y medición confocal de alta resolución y un perfilómetro óptico.

El DCM 3D es ideal tanto para la visualización como para la medida de forma y rugosidad de superficie y capas en la escala micrométrica y nanométrica.

Además, resulta apto para la medida de superficies con pendientes locales muy elevadas, muestras de baja reflectividad o compuestas por materiales similares. También es capaz de realizar evaluaciones de forma muy rápida y sin contacto, lo que supone un gran ahorro de tiempo, y la posibilidad de observar la muestra sin que ésta sufra ningún tipo de modificación. En la figura 2 se muestra una fotografía de este equipo.



Figura 2. Fotografía del DCM 3D

(Leica DCM 3D Dual Core 3D Profiler combines Confocal Imaging and Interferometry)

El sistema DCM 3D, también es capaz de adquirir imágenes interferométricas, con sólo incorporar los objetivos adecuados para ello (interferométricos).

5.1.2 Componentes

Una de las características importantes del equipo es que posee un diseño muy robusto y compacto. A continuación se describen algunos de sus componentes y sistemas más importantes:

El **cabezal** del equipo, está soportado por una columna de granito, que permite su desplazamiento vertical, lo que hace posible trabajar con piezas de muy distintas alturas de forma fácil y eficaz. Además dispone de un sistema de enfoque motorizado de alta resolución con un rango de trabajo de 40 mm, dotado de detección automática de final de recorrido, tanto en la posición inferior como en la superior.

La **platina** que lleva instalada, está motorizada en X-Y, contando con un recorrido de 154×154 mm, una resolución de 40 nm y una capacidad máxima de carga máxima de 20 kg.

Los **objetivos** del equipo, están montados en un único porta-objetivos motorizado múltiple de 6 posiciones; éstos son intercambiables y pueden ser actualizados. Los objetivos que se adquirieron fueron todos confocales y compatibles con la visión en el campo claro y campo oscuro:

- Objetivo Confocal 5× HC PL FL: es un objetivo de aumentos bajos, para medidas en el rango micrométrico. Permite el análisis con alta precisión de una amplia zona de la muestra gracias al sistema de seguimiento de enfoque e imágenes panorámicas con precisión metrológica. Tiene una apertura numérica de 0,15.
- Objetivo Confocal 10× HC PL FL: óptimo para la visualización y caracterización de superficies con rugosidad media a escala micrométrica. Su apertura numérica (0,3), permite realizar análisis de rugosidad equivalentes a los obtenidos con un sistema táctil, ya que su capacidad de resolver detalles es comparable a un perfilómetro/ rugosímetro con punta de 2 micras.
- Objetivo Confocal 20x HC PL FL: presenta un excelente compromiso entre apertura numérica (0,5), distancia de trabajo y aumentos, lo que le convierte en un objetivo óptimo para obtener gran definición en múltiples campos de la muestra a gran velocidad.
- Objetivo Confocal 50 x HCX PL APO: objetivo de altos aumentos para observar microestructuras con mayor detalle gracias a su elevada apertura numérica, (0,9).
- Objetivo Confocal 50x N PLAN L Larga Distancia de Trabajo: objetivo de altos aumentos y larga distancia de trabajo para adquisición topográfica sobre áreas de

difícil acceso, o con obstáculos físicos, para el enfoque a distancias normales de trabajo. Su apertura numérica es de 0,5.

- Objetivo Confocal 150x HCX PL APO: objetivo de muy altos aumentos, con la mayor apertura numérica, (0,95), para la observación y medida de microestructuras con la máxima resolución al alcance de la tecnología confocal.

Los objetivos de apertura numérica elevada (0,95) y gran aumento, facilitan la medición de superficies lisas, que pueden presentar incluso desniveles con una inclinación de más de 70°.

Generalmente, un objetivo con una gran apertura numérica (NA) está ligado a un mayor aumento, lo que reduce el campo visual a unas pocas micras.

Para superar esta limitación, el Leica DCM 3D ofrece una función para generar imágenes topográficas panorámicas (“stitching”). Dicha función, permite combinar las secciones adquiridas en modelos tridimensionales, generando un área mucho más amplia que un campo visual individual. Los datos finales de la superficie muestran un modelo continuo de alta precisión en un área amplia de la muestra, manteniendo la textura enfocada y las propiedades originales de un campo individual.

Otra de las características importantes de este equipo, es que cuenta con un **sistema de autoenfoque**, que permite trabajar con la muestra siempre enfocada. En el caso de muestras irregulares con textura, este método permite obtener la mayor parte de la imagen siempre en foco.

El **sistema de iluminación** del DCM 3D, cuenta con un sistema dual, basado en leds. Incluye, integrado dentro del propio cabezal, una fuente de luz azul (460 nm) de corta longitud de onda para medir con la máxima precisión, y una fuente blanca (imagen convencional y confocal en color), para poder obtener iluminaciones homogéneas y colores reales de la textura de la muestra. Ambas fuentes se controlan de forma electrónica, sin ningún componente mecánico, estando así libres de vibraciones que puedan afectar a las medidas. Por otra parte, los leds tienen un tiempo de vida medio antes de fallo muy elevado (25.000 horas de trabajo continuo).

El **sistema de captación de imagen**, incluye dos dispositivos, cada uno con un propósito definido. El primero es una cámara en blanco y negro metrológica de alta velocidad que permite obtener resultados metrológicos reproducibles. El segundo es una cámara en color específicamente diseñada para optimizar la reproducción de texturas y colores de la muestra.

En cuanto al **Software**, el equipo incorpora dos, el LeicaScan que es un software gráfico interactivo para la adquisición, análisis, procesado y visualización de datos y el LeicaMap, para la realización de análisis, que dota al equipo de una gran cantidad de parámetros, estadísticas y posibilidades de preparación de informes.

El equipo dispone de seis **tecnologías de inspección y medición** que permiten caracterizar un campo de visión con la técnica que mejor se adapte a la muestra. Sin embargo, debido a la configuración adquirida, solo se tiene la posibilidad de llevar a cabo las que se describen a continuación:

- Microscopia Convencional de Campo Claro: permite inspeccionar una superficie, obtener imágenes de la misma y seleccionar aquellas regiones de mayor interés en las que deben realizarse medidas de topografías 3D.
- Microscopía Convencional de Campo Oscuro: con este sistema es posible ver en tiempo real la muestra, e identificar los detalles más finos, ya que cuenta con un potente algoritmo de detección de bordes.
- Microscopía Confocal Blanco y Negro (B/N), Color y Perfilometría: es ideal para la obtención de imágenes con el máximo contraste y para la medida de topografías 3D en superficies pulidas y rugosas. Mediante la utilización de esta técnica la muestra es escaneada verticalmente en una serie de planos predefinidos de manera que cada punto de la superficie pase a través del nivel del foco. Toda la información de la imagen que se encuentra fuera del foco es eliminada. Se obtiene la altura de la superficie en cada pixel, detectando el pico de la respuesta axial con resolución nanométrica. Dado que solo uno, o unos pocos puntos de la superficie están iluminados en el mismo momento, también se realiza un escaneado en cada plano individual para la obtención de dicha respuesta axial, dando lugar a la correspondiente imagen confocal. La imagen confocal permite obtener la mayor resolución lateral posible en un sistema óptico, alcanzando resoluciones laterales mejores de 140 nm y resoluciones verticales mejores de 1 nm.

5.1.3 Condiciones de instalación

Para el buen funcionamiento de los equipos, se requieren unas condiciones ambientales y de espacio adecuadas. Estas condiciones se presentan en la tabla V:

Temperatura	Entre 5 °C y 40 °C
Humedad relativa	< 80 %
Altitud	< 2000 metros

**Tabla V. Condiciones de operación del DCM 3D
(Leica Microsystems)**

Estas condiciones se cumplen, ya que el laboratorio se encuentra siempre a una temperatura de entre 20 y 22°C y humedad relativa siempre menor al 80 %. Además las instalaciones de Repsol se encuentran en la ciudad madrileña de Móstoles cuya altitud es aproximadamente de 660 metros.

El equipo cuenta con tres tomas eléctricas de 220V (Monofásica), su peso aproximado (con un objetivo) es de 16,5 kg y el espacio requerido, atendiendo a sus dimensiones, se muestra en la figura 3.

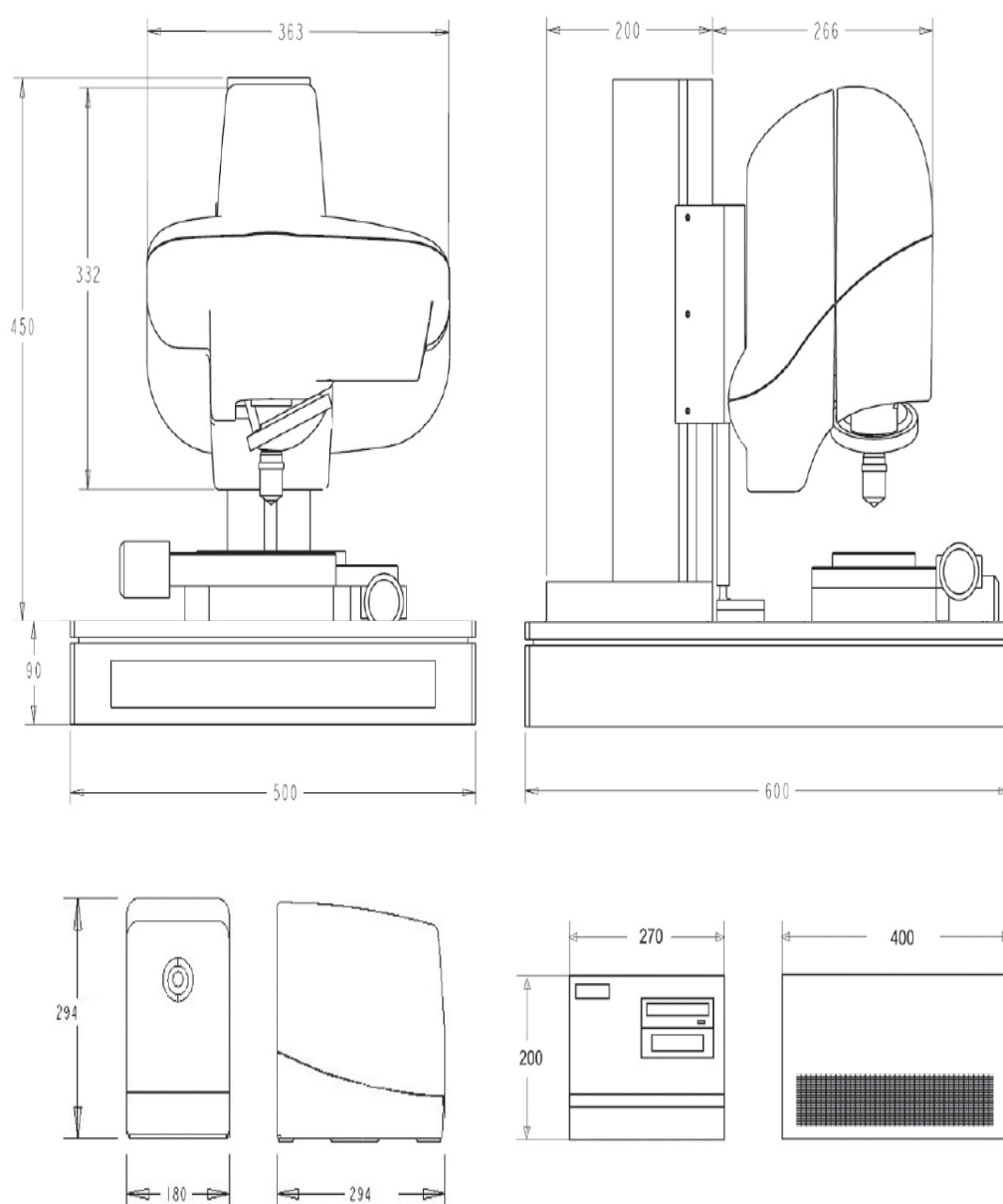
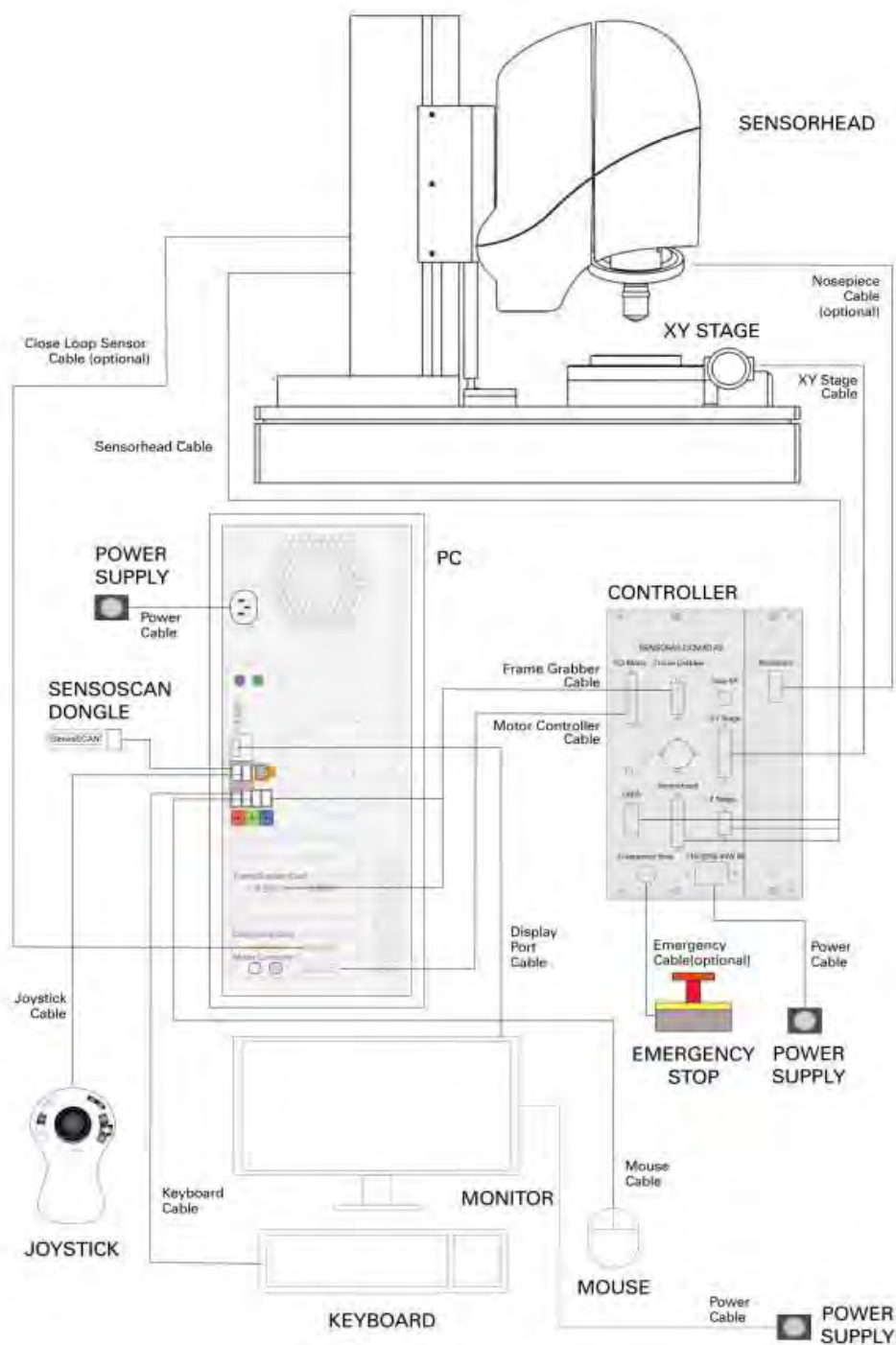


Figura 3. Vistas acotadas del equipo DCM 3D (todas las dimensiones en milímetros)
(Leica Microsystems)

La configuración general se presenta en la figura 4:



**Figura 4. Configuración general del microscopio DCM 3D
(Leica Microsystems)**

33

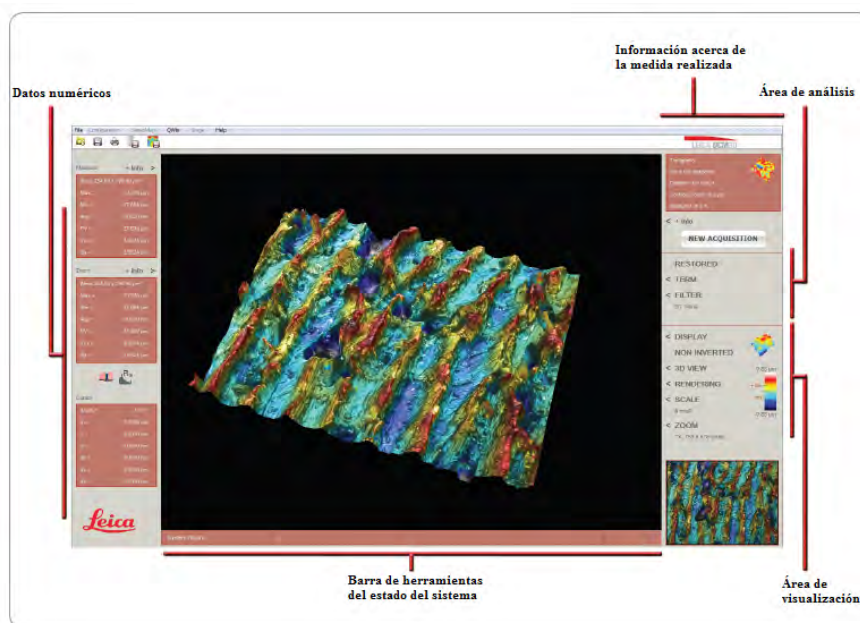


Figura 6. Pantalla de visualización del microscopio.

(Leica Microsystems)

La **pantalla de configuración** se utiliza para, seleccionar opciones de software y componentes de hardware, alinear y calibrar los objetivos. Los procedimientos de alineado y calibrado, se realizan con un espejo plano perfectamente pulido. En la figura 7, se pueden observar los elementos principales de esta pantalla.

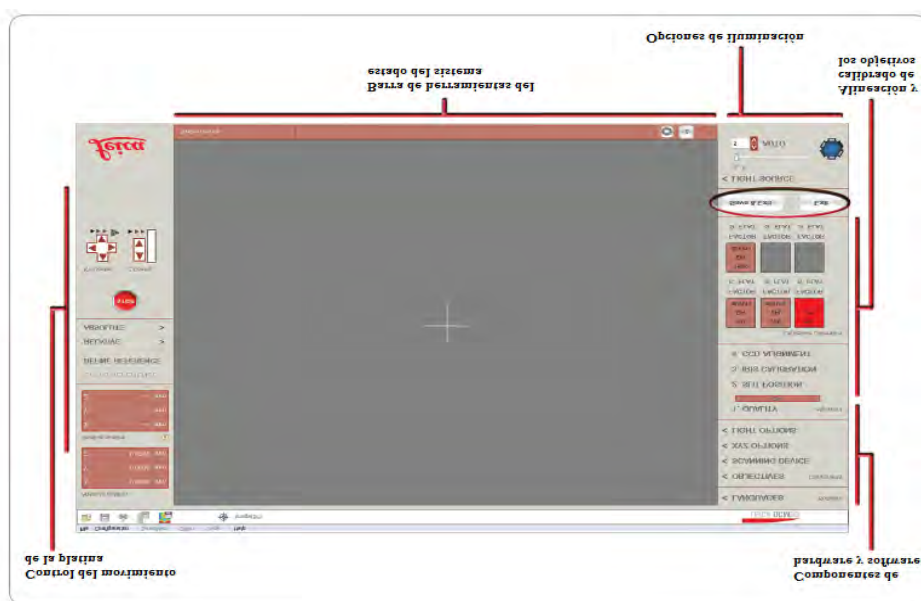


Figura 7. Pantalla de configuración del microscopio.

(Leica Microsystems)

5.1.5 Software Leica MAP

El software Leica Map está orientado al análisis detallado de las imágenes adquiridas en el software LeicaSCAN. Este software cuenta con una única ventana, cuyos elementos principales se muestran en la figura 8.

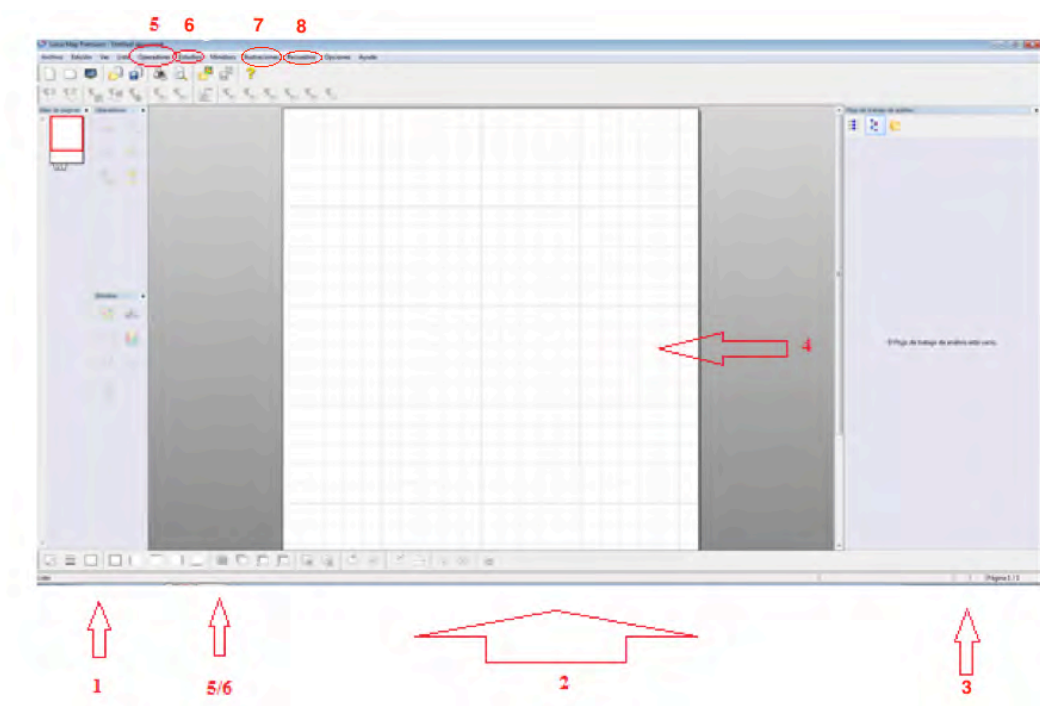


Figura 8. Pantalla del software Leica Map. 1-visor de páginas, 2-documento, 3-lista de estudiabiles, 4-estudiabiles, 5-menú operadores, 6-menú estudios, 7-ilustraciones, 8-recuadro. (Leica Microsystems)

A continuación se explica brevemente todas las partes de la figura 8.

1. Visor de páginas: muestra todas las páginas del documento y da acceso directo a algunas funciones relacionadas con estas páginas, tales como, insertar páginas, quitar la página seleccionada o imprimirla. También se puede navegar por el documento y visualizar el flujo de trabajo, que ofrece una vista de árbol, de todos los elementos del documento (superficies, perfiles, operadores analíticos y estudios) y muestra gráficamente las relaciones de dependencia entre esos elementos.

2. Documento: designa el conjunto de las páginas en las que se van a generar, ilustrar y compaginar estudios.

3. **Lista de estudiables:** ventana donde se almacenan y visualizan todos los estudiables, tanto si se han creado desde un operador, como si se han cargado desde el disco, o se han medido directamente.

4. **Estudiables** mostrados como estudios en el documento: término que hace referencia a todos los datos (perfiles, superficies...) que se pueden estudiar y almacenar en un archivo. En función de su paquete de software, se pueden estudiar distintos tipos de estudiables, tales como, series de perfiles, superficie en 3D, imagen en color real, imagen binaria, etc.

5. **Menú operadores:** permite modificar el estudiable medido (perfil, superficie...). Un operador es una transformación matemática aplicable a un estudiable, con objeto de generar otro, conservando el estudiable original. Los operadores disponibles, varían en función del tipo de estudiable seleccionado. Algunos de ellos son: rectificación, nivelación, rellenado de los puntos no medidos, crear una serie de perfiles, supresión de forma, etc.

6. **Menú estudios:** permite visualizar y analizar el estudiable medido. Un estudio es una representación gráfica de un estudiable (representación 3D de una superficie) o un análisis realizado en un estudiable (cálculo de un parámetro). Igual que en el caso de los operadores, los estudios cambian en función del estudiable seleccionado. Algunos de ellos son: vista en 3D, superficie de un hueco, medida de distancias, volumen de un pico/hueco, etc.

7. **Ilustración:** es un recuadro que contiene texto o gráficos, que permiten presentar de un modo claro, los estudios realizados en un documento, es decir, con esta herramienta pueden crearse cuadros de texto explicativos, así como escribir leyendas o poner límites de tolerancia.

8. **Recuadro:** se refiere a un marco dentro del documento. No puede contener un estudio ni una ilustración, tampoco se puede mover ni cambiar de tamaño. En los recuadros hay varias opciones disponibles: botón paleta (permite seleccionar la paleta de colores que se empleará para la presentación de alturas en las superficies), botones de ajuste de escala, editar escala de color, etc.

El programa dispone, además, de algunas opciones, que hacen más cómodo el trabajo, y que además, pueden facilitar los trabajos futuros. Una de estas opciones es el uso de plantillas, que permiten automatizar los análisis y el modo en que se presentan. También cabe destacar, que las páginas del documento, están compuestas por dos "capas", por lo que se podrá editar una página maestra, que será la primera de ellas y en la que únicamente se podrá colocar recuadros de tipo ilustraciones (ilustración, texto). La página maestra es idéntica para todas las páginas de un mismo documento.

5.2 Sistema de microscopía confocal espectral TCS-SP8 con microscopio invertido DMI6000CS

5.2.1 Descripción del equipo

El TCS-SP8 es un microscopio confocal de barrido laser (figura 9), principalmente orientado a la fluorescencia, aunque también incorpora detectores para luz reflejada y transmitida.



Figura 9. Fotografía del sistema de microscopía TCS SP8 con microscopio invertido DMI6000CS.

(Leica-microsystems)

El Leica TCS SP8 fue diseñado para microscopía confocal, con rendimiento fotónico óptimo y alta velocidad. Todos los componentes ópticos, se acoplan preservando la fluorescencia fotónica para el contraste de imagen. Respaldando esta detección sensible, hay un sistema de barrido punto a punto, de alta velocidad, con hasta 428 imágenes por segundo, gran campo de visión, y apilamiento en Z acelerado. Esto hace que el instrumento pueda adaptarse a las muestras más exigentes, con una velocidad máxima y una resolución confocal completa.

Por otra parte, sistema Leica TCS SP8, se basa en un concepto flexible, pudiendo ser adaptado a una amplia gama de aplicaciones, debido a su organización en módulos que pueden ser adquiridos y agregados.

5.2.2 Componentes

- MÓDULO CONFOCAL ESPECTRAL TCS SP8

El TCS SP8 es un módulo confocal de barrido punto a punto, dotado de un sistema de detección espectral, mediante análisis de la luz por prisma, y por tanto, carente de dicróicos secundarios o filtros barrera.

Todos los elementos del módulo confocal están motorizados y controlados electrónicamente, siendo sus características principales las siguientes:

1. Sistema de Barrido FOV (*Field of view*)

El tamaño de la zona visible de una imagen microscópica, se determina por el campo de visión del microscopio. El diseño óptico, formado por las lentes del objetivo, la óptica y el sistema de barrido, afecta al campo de visión. Para poder obtener un gran campo de visión, se intenta conseguir una iluminación homogénea de la zona, sin perder resolución del centro al borde.

El sistema de barrido de Leica usa la configuración x2y (en lugar de la habitual xy), es decir, utiliza tres espejos de barrido, uno para la dimensión x y dos para la dimensión y. Uno de los espejos del sistema de barrido es sustituido por dos espejos conjugados, que se mueven de forma sincronizada, para conseguir que el rayo de luz se encuentre siempre centrado en la pupila posterior de objetivo, obteniéndose una iluminación tan homogénea que permite extender el campo de barrido al máximo, consiguiendo así, un campo de visión con una diagonal de 22 milímetros, el mismo que en oculares.

2. Sistema de barrido de alta resolución

La resolución máxima del equipo es de 8.192×8.192 píxeles. Esta gran resolución, permite el muestreo correcto de la imagen según el criterio de Nyquist, incluso en los objetivos de menos aumentos, siendo de esta forma posible obtener imágenes panorámicas en alta resolución, sin pérdida de información. Además cuenta con un sistema de refrigeración que disminuye radicalmente el ruido electrónico, y aumenta la calidad de la imagen.

La velocidad de barrido es variable entre 1 y 1.800 Hz, alcanzando hasta 3.600 Hz en modo bidireccional, para una frecuencia máxima de 7 fps (imágenes por segundo) a 512×512 y de 70 fps a 512×16 .

Además, con este sistema de barrido, se pueden adquirir imágenes de series multidimensionales: área de la imagen, altura, tiempo, longitud de onda e intensidad.

3. Detección espectral basada en prisma

El sistema de detección espectral de este microscopio permite el ajuste independiente de cada detector para adaptarse a las características de la señal.

El análisis de la luz emitida por la muestra, se realiza mediante prisma, con una transmisión de luz superior al 97 % desde 400 hasta 800 nm, independientemente del plano de polarización de la luz.

La luz que no es recogida en el primer canal, es reflejada hacia el segundo y tercer canal, y desde estos al cuarto y quinto, en un diseño que elimina los dícticos secundarios y filtros barrera, asegurando así la máxima transparencia.

El ancho de banda de detección, es ajustable independientemente para cada canal entre 5 y 400 nm, con un paso mínimo de 1 nm y una resolución espectral mínima de 2,5 nm, con un rango de trabajo libremente ajustable entre 400 y 800 nm.

El equipo cuenta con tres detectores, dos de ellos son fotomultiplicadores (PMT) de alta sensibilidad y bajo ruido, utilizándose uno para fluorescencia y reflexión y el otro para luz transmitida. El tercer detector es un detector híbrido de alta sensibilidad (HyD) para fluorescencia y reflexión.

El objetivo del fotodetector es convertir la luz en señales eléctricas. Por lo tanto, es una parte crítica del proceso de grabación de la imagen. No solo debe recoger la luz de fluorescencia de la forma más eficiente posible, sino que también, debe tener un gran rango dinámico, rápida respuesta y escaso ruido, para producir imágenes nítidas y cuantificables. Durante mucho tiempo los tubos fotomultiplicadores (PMT) y sus derivados, como los conjuntos multiánodos, han sido la norma en fotodetectores confocales. Su gran rango dinámico y su nivel razonable de ruido contribuían a este éxito.

Sin embargo, los PMT tienen limitaciones para la cuantificación y obtención de imágenes de poca luz, por la sensibilidad limitada y la lenta respuesta de los impulsos. Debido a esto, para la obtención de imágenes con poca luz, se emplean los foto-diodos de avalancha (APD). Sin embargo, debido a su escaso rango dinámico y a los largos estados oscuros, las APD sólo se utilizan como detectores, para fines especiales.

Ahora bien, los fotodetectores híbridos, como el HyD de Leica, combinan elementos de ambos: PMT y APD. En lugar de una larga cascada de dínodos, como en PMT (figura 10 izquierda) con posibilidad de pérdida de fotones y propagación de ruido, utilizan una geometría simple con un paso de bombardeo de electrones (figura 10 derecha), que produce una gran ganancia (10^3) en un solo paso.

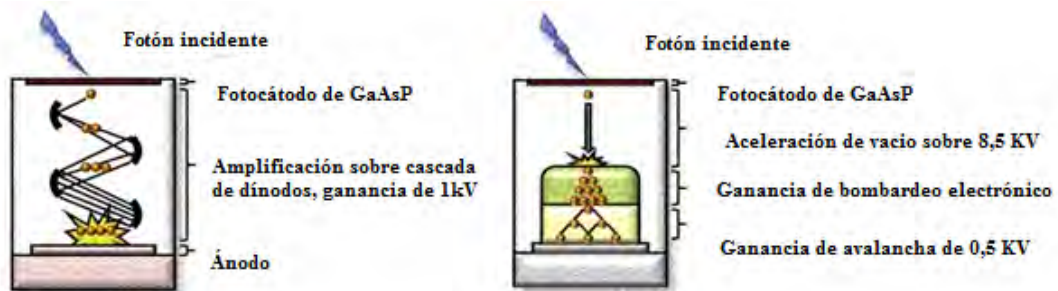


Figura 10. Principio de trabajo de varios fotodetectores: fotomultiplicadores (izquierda) y detectores híbridos (derecha).

(Leica-microsystemens)

Ambos detectores utilizan el efecto fotoeléctrico en el fotocátodo para convertir la luz en electricidad. Sin embargo, la amplificación posterior difiere en gran medida. Los PMT utilizan una cascada de dínodos para crear ganancia, mientras que los HyD usan un proceso de dos pasos que incluye un paso de bombardeo de electrones y ganancia en avalancha. Por lo tanto, los HyD producen imágenes con

buen contraste, buena relación de señal-ruido y tienen excelentes propiedades de recuento de fotones para la cuantificación.

Al usarse un detector para cada canal, el ajuste de la ganancia y el offset, también es independiente para cada canal, permitiendo adaptar la detección a las características de cada una de las emisiones.

4. Divisor de haz

Uno de los desafíos de la microscopía de fluorescencia, incluida en la microscopía confocal, es conseguir separar la luz de excitación (procedente de los láseres) y la luz fluorescente que emite la muestra tras haber sido excitada. La señal de fluorescencia, es mucho más débil que la de excitación (alrededor de 10^{-5} veces más débil), esto hace, que para la detección de la luz fluorescente, sin contaminación de la luz de excitación, el divisor de rayos sea un componente fundamental, para contrastar la imagen en la dirección del rayo.

Los divisores de rayos dicróicos o espejos dicróicos, actúan como un espejo semitransparente que selecciona la longitud de onda, es decir, la luz azul se refleja, mientras que la verde pasa a través de ellos. Esto significa que los espejos dicróicos, se seleccionan según el desplazamiento de las barras de un marcador fluorescente.

Las propiedades espectrales concretas de un divisor de rayos, se determinan mediante una capa fina de recubrimientos ópticos en un sustrato de cristal. Los divisores de rayos dicróicos son filtros de interferencia. El recubrimiento es fijo, por lo tanto, para cada combinación de marcador/láser se requiere un divisor de rayos específico. Para ello se suele colocar un conjunto de filtros en un disco o deslizador móvil, para situarlo dentro y fuera de la trayectoria del rayo según sea necesario.

El diseño tradicional utiliza un ángulo de 45° para el espejo dicróico, lo que facilita la separación geométrica de la luz de emisión y excitación, al ser sus rayos ortogonales. Sin embargo, este diseño no es igual de permisivo en distintos ángulos de la luz polarizada. Como consecuencia, se pierde una parte de la luz fluorescente; lo que ocurre es que su plano de polarización tiene la orientación inadecuada. La explicación es el denominado ángulo de Brewster. Que la luz se transmita o refleje en una interfase de aire-cristal depende de su ángulo de incidencia. Para las interfases de aire-cristal, el ángulo de Brewster es, de alrededor de 56° , demasiado cerca de los 45° que se utilizan normalmente para los espejos dicróicos. Cuando el ángulo de la luz incidente es mucho menor que 45° , este efecto se elimina.

En la actualidad existen dicróicos de luz de baja incidencia, que mejoran el contraste y la sensibilidad en comparación con los anteriores divisores de rayos.

Sin embargo, dado que los espejos dicróicos son filtros, siempre pierden cierta luz fluorescente, y además, el hecho de que estén confinados a una cierta longitud de onda limita mucho la flexibilidad del instrumento confocal. La pérdida de luz en los dicróicos ocurre no sólo por la transmisión inferior al 100 % sobre la longitud de onda de división, sino sobre todo, por las características de los filtros cerca de esta longitud de onda. Normalmente los divisores de rayos dicróicos, suprimen una banda alrededor de la longitud de onda del láser de unos 20 nm de ancho. Como esta región espectral suele contener el máximo de emisión del espectro de un marcador, se perderá luz.

El TCS SP8 resuelve este problema mediante el divisor de rayos acústico-óptico (AOBS), que introduce una tecnología divisora de rayos que actúa simultáneamente como multiplexor para varias longitudes de onda.

El AOBS, es un cristal fabricado con óxido de telurio (TeO_2), homólogo del cuarzo, que actúa como deflector específico de la longitud de onda. Para ello, se acopla una onda acústica del rango de los kHz en el cristal, cambiando así sus propiedades de dispersión. Este principio se aplica hasta a ocho longitudes de onda a la vez, superponiendo varias frecuencias acústicas. El principio físico subyacente, se basa en deformaciones de la red cristalina que incluye sus electrones. Interactúan con el campo eléctrico de la luz incidente y, por lo tanto, lo guían de forma distinta en función del desplazamiento respectivo de los electrones.

En la práctica, especialmente en la imagen multiespectral, el corte pronunciado del AOBS divide el rayo de forma más eficaz al permitir detectar más luz. Además, al utilizar espejos dicróicos, ciertas combinaciones de marcadores, no pueden grabarse simultáneamente. Por lo tanto, no existe dicha combinación de filtro que limite la flexibilidad experimental para combinar libremente cualquier marcador fluorescente, permitiendo grabar en paralelo bandas de emisión muy estrechas.

El AOBS se reprograma para una longitud de onda distinta en microsegundos, y se divide simultáneamente hasta en 8 líneas de láser. Por lo tanto, la exploración secuencial en línea permite más grabación multicanal pseudosimultánea además de las simultáneas.

5. Lectura digital de la señal

El TCS SP8 realiza un muestreo digital de la señal acumulada en los fotomultiplicadores, a una frecuencia constante de 40 MHz, es decir, cada 25 ns, realizándose un promedio de las lecturas realizadas en cada pixel.

Así, si el tiempo de pixel es de 250 ns, la señal se promedia 10 veces. Este sistema ofrece grandes ventajas:

- Eliminación de tiempos muertos: durante todo el tiempo de pixel se está adquiriendo señal.
- El promedio intrínseco de la imagen reduce mucho el ruido, permitiendo obtener imágenes más limpias, usar ganancias muy altas en los PMT y/o por lo tanto, reducir la potencia de láser utilizada, disminuyendo de este modo la fototoxicidad y el fotoblanqueo de la muestra.
- Digitalización de la señal a 8 ó 12 bits.

• LÁSERES DEL SISTEMA

La calidad, estabilidad y precisión en el control de la iluminación láser, es esencial para conseguir la máxima resolución de imagen, y cuantificaciones fiables en microscopía confocal.

El equipo cuenta con cuatro láseres en estado sólido, cuyas características pueden verse en la tabla VI.

Tipo de láser	Longitud de onda (nm)	Máxima potencia lumínica en la salida del saler (MW)	Máxima potencia lumínica en el plano focal (MW)	Duración del pulso
Diodo 405	405	< 120	< 7	Regimen continuo (cw)
OPLS 488	488	350	10	Regimen continuo (cw)
OPLS 552	552	350	10	Regimen continuo (cw)
Diodo 638	638	350	10	Regimen continuo (cw)

Tabla VI. Láseres del TCS SP8.
(Leica-microsystems)

- MICROSCOPIO INVERTIDO AUTOMÁTICO DMI6000CS

El DMI6000CS es un microscopio invertido de investigación motorizado, para luz transmitida y fluorescencia en luz incidente. Los componentes automatizados, dotan al instrumento de mayor estabilidad, repetitividad y ergonomía.

Los **objetivos** del equipo, están montados en un único porta-objetivos motorizado múltiple de 5 posiciones; éstos son intercambiables y pueden ser actualizados. Los objetivos que se adquirieron se presentan en la tabla VII:

Nombre	Aumentos	Apertura Numérica	Tipo
HC PL FLUOTAR	5x	0,15	Seco
HC PL FLUOTAR	10x	0,30	Seco
HC PL APO CS	20x	0,70	Seco
HC PL APO CS2	20x	0,75	Multi-inmersión (agua, aceite, glicerol)
HC PL APO CS2	63x	1,40	Inmersión en aceite

Tabla VII. Objetivos del microscopio.
(Leica-microsystems)

Las **técnicas de contraste** disponibles en el microscopio son:

1. Iluminación de fluorescencia:

La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia, que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiación electromagnética, y luego, emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente.

Para realizar la iluminación por fluorescencia, se cuenta con una lámpara (EL6000), de metal de haluro de 120W, montada externamente al microscopio, al que se conecta por fibra óptica líquida.

2. Campo claro:

Permite inspeccionar una superficie, obtener imágenes de la misma y seleccionar aquellas regiones de mayor interés.

La **platina**, es motorizada, y puede controlarse mediante un joystick, o desde el propio software del equipo. Cuenta con un rango de movimiento de 127 x 83mm, con un paso mínimo de 50 nm, una reproducibilidad de 0,75 micras y una precisión de +/- 3micras.

5.2.3 Condiciones de instalación

Para el buen funcionamiento de los equipos se requieren unas condiciones ambientales y de espacio adecuadas. Estas condiciones se presentan en las tablas VIII y IX:

Humedad relativa permitida	Entre un 20% y un 60% (sin condensación)
Altitud máxima	2000 m sobre el nivel del mar
Grado de contaminación	2 (sistema de protección contra el polvo en caso de ser necesario).
Rango de temperatura de funcionamiento	Entre 18 y 25 °C
Comportamiento óptico óptimo a	22°C ± 1°C

Tabla VIII. Condiciones ambientales de funcionamiento.

(Leica-microsystems)

Estas condiciones se cumplen, ya que el laboratorio se encuentra siempre a una temperatura de entre 20 y 22 °C, y humedad relativa entre el intervalo permitido. Además las instalaciones de Repsol se encuentran en la ciudad madrileña de Móstoles, cuya altitud es aproximadamente de 660 metros.

Dimensiones del sistema (longitud x profundidad x altura)	253 x 110 x 140 cm
Espacio mínimo requerido (longitud x profundidad)	373 x 280 cm
Peso del sistema básico	Máximo 330 kg
Capacidad de carga estática mínima	200 kg/m ²
Espacio para pasar	Al menos 100 cm
Espacio libre a la derecha, izquierda y detrás del sistema	60 cm
Espacio libre en frente del equipo	110 cm

Tabla IX. Dimensiones y espacio requerido.

(Leica-microsystems)

Como se expuso en el apartado 4.3 se realizaron varias modificaciones del laboratorio de microscopia antes de la llegada de los equipos, dejándolo todo preparado para su recepción y evitar de esta forma problemas de polvo o vibraciones.

En la figura 11, se muestra un esquema de las dimensiones y espacio requerido para la instalación y posterior manejo del equipo.

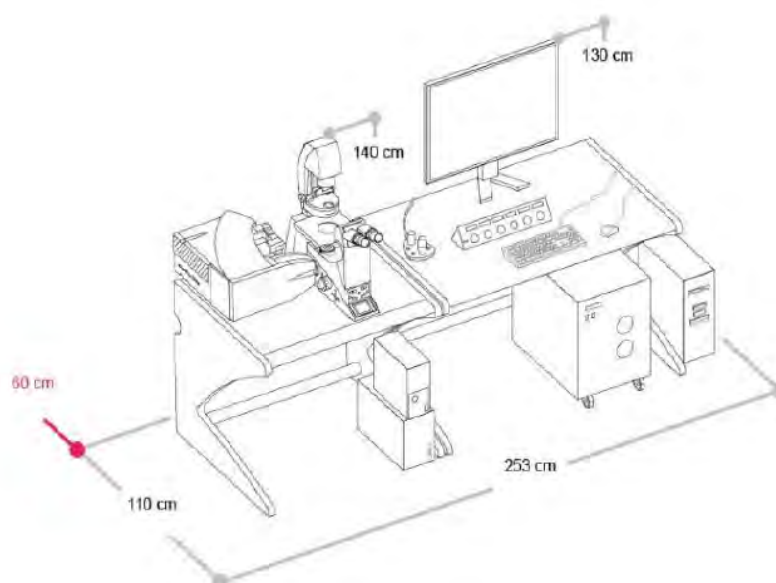


Figura 11. Dimensiones y espacio requerido por el microscopio.
(Leica-microsystems)

Las vibraciones se deben reducir al mínimo, por esa razón se aconseja que el sistema esté alejado de fuentes de vibración, tales como centrifugas, bombas, compresores, refrigeradores, ascensores, etc. A continuación en la tabla X, se muestran las condiciones máximas aceptables.

Rango de frecuencia [5 Hz - 30 Hz]	Menos de 30 $\mu\text{m/s}$
Rango de frecuencia [>30 Hz]	Menos de 60 $\mu\text{m/s}$

Tabla X. Condiciones de vibración máximas aceptables.
(Leica-microsystems)

Los cuatro láseres del sistema son de clase 3B/IIIb, es decir, la visión directa del haz es peligrosa, pudiendo causar daños oculares agudos o crónicos, siendo la visión de reflexiones difusas normalmente seguras.

Las especificaciones eléctricas se muestran en la tabla XI.

Tensión de alimentación	Entre 100 V y 240 V \pm 10 %
Frecuencia	50/60 Hz
Fuente de alimentación	Dos circuitos eléctricos independientes (uno para el suministro de alimentación de la unidad compacta y otro para el suministro de dispositivos periféricos), con voltaje de fuente de alimentación entre 100 V y 120 V y fusible de protección de 20 A o voltaje de fuente de alimentación entre 200 V y 240 V con fusible de protección de 12 - 16 A.

Tabla XI. Especificaciones eléctricas.
(Leica-microsystems)

5.2.4 Software LAS AF

Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF), es una plataforma de software, para la investigación de materiales que pueden presentar fluorescencia mediante un sistema confocal.

LAS AF permite un control completo del hardware del microscopio, y a la vez, reduce la necesidad de interacción del usuario mediante la automatización inteligente, por ejemplo, permite abrir y cerrar obturadores según el método de contraste seleccionado, o cambiar los prismas al cambiar objetivos. Todos los parámetros del sistema se pueden aplicar a otros experimentos para optimizar la reproducibilidad.

El software cuenta con cuatro ventanas diferentes, la de configuración, la de adquisición, la de procesamiento y la de cuantificación, que podrán seleccionarse en la parte superior de la pantalla.

La **pantalla de configuración** (figura 12), dispone de un menú que permite encender y apagar los láseres, configurar los componentes que influyen en la trayectoria del haz, configurar los elementos del sistema que intervienen en la adquisición, visualización o almacenamiento de imágenes, acceder a la base de datos de espectros de excitación y emisión de distintos fluorocromos, etc.

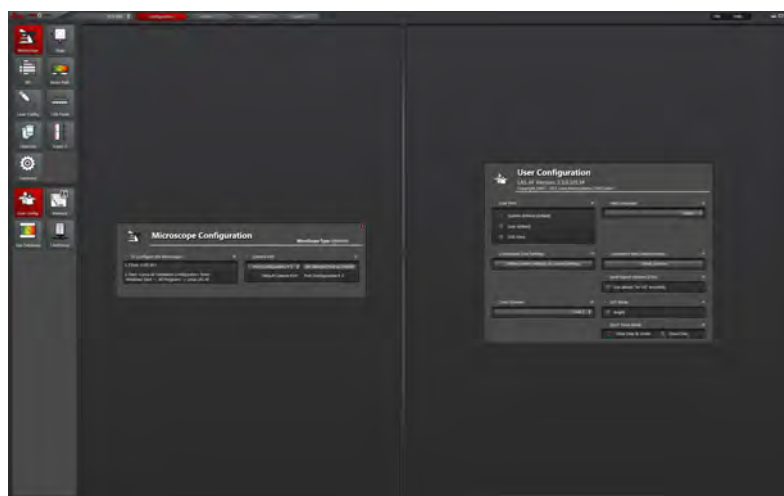


Figura 12. Pantalla de configuración del software LAS AF.
(Leica-microsystems)

La **pantalla de adquisición** (figura 13), es la que aparece por defecto al encender el equipo, ya que es con la que se realizará la adquisición de la imagen.

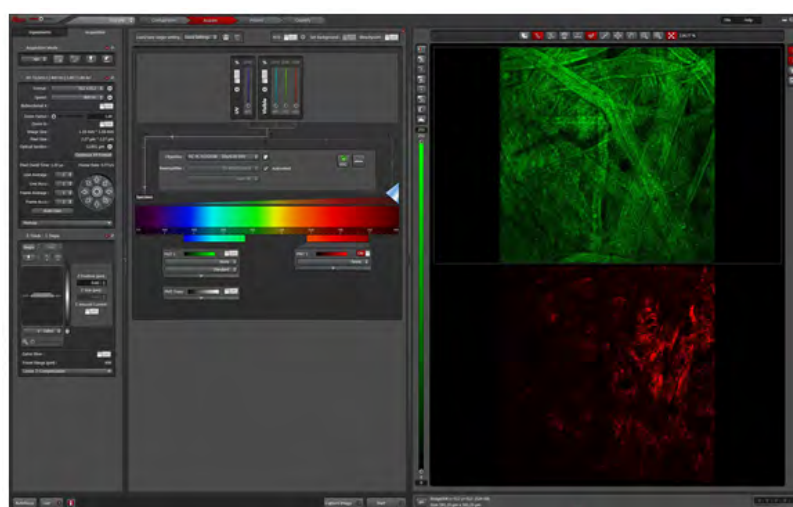


Figura 13. Pantalla de adquisición del software LAS AF.
(Leica-microsystems)

En esta pantalla se dispone de varios desplegables en los que se irán mostrando las diferentes opciones para adquirir la imagen que más convenga en cada caso, ya sea una vista de la planta de la muestra (plano xy), una sección transversal (plano xz), una imagen en función del tiempo (t), o la visualización de los espectros de emisión de las muestras (λ). También permite realizar la adquisición de series de imágenes, pudiendo de esta forma, reproducir una imagen en tres dimensiones.

En esta ventana también se muestra la trayectoria del haz de forma esquemática, permitiendo seleccionar y ajustar los láseres y los componentes del sistema a lo largo de esta trayectoria, así como los detectores (dos de fluorescencia y luz reflejada, y uno de luz transmitida, en el caso del equipo adquirido por Repsol) para realizar la adquisición de la imagen.

La **pantalla de procesado** (figura 14), es a través de la que se pueden editar imágenes o series de imágenes adquiridas previamente.

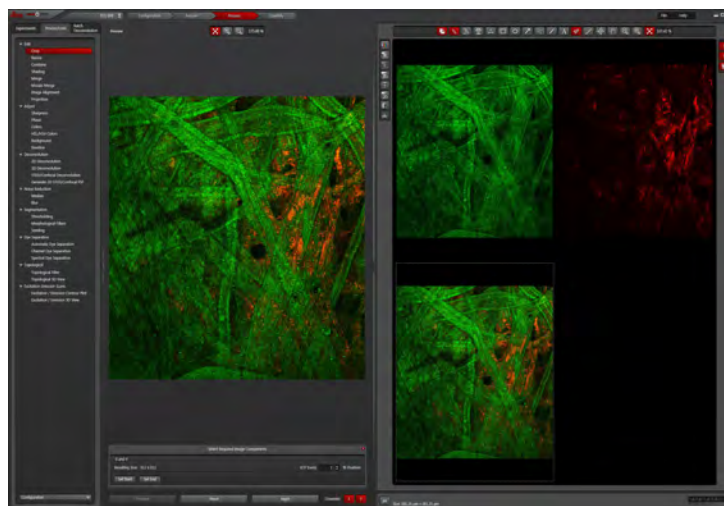


Figura 14. Pantalla de procesado de imágenes del software LAS AF.
(Leica-microsystems)

La **pantalla de cuantificación** (figura 15), permite realizar evaluaciones cuantitativas de las imágenes o series de imágenes adquiridas.

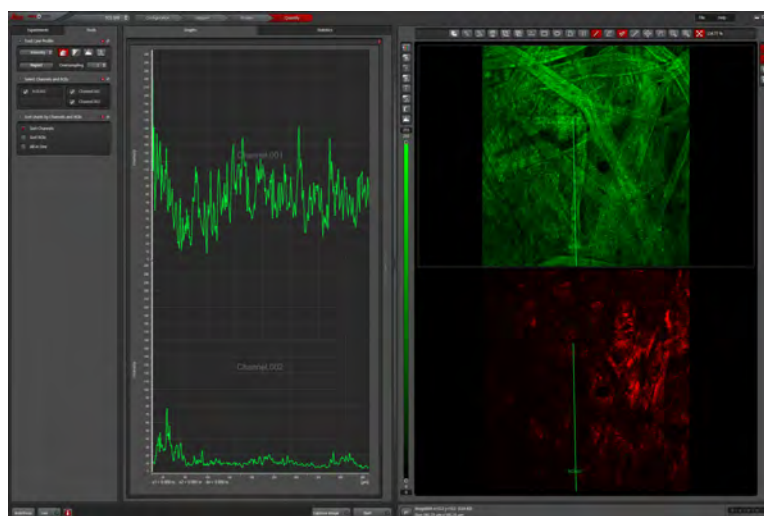


Figura 15. Pantalla de cuantificación del software LAS AF.
(Leica-microsystems)

Capítulo 6

Aplicaciones desarrolladas en la Dirección de Tecnología de Repsol

6.1 Introducción

Las aplicaciones de la microscopía confocal son muy diversas, abarcando importantes ramas de la ciencia, como ya se citó en el Capítulo 2 (Introducción).

Dentro del Centro Tecnológico de Repsol, existen diferentes áreas, con necesidades muy diferentes, para las que esta técnica puede ser de mucha ayuda. A continuación se presentan algunas de estas áreas, con las respectivas necesidades que se pueden cubrir gracias a los nuevos equipos.

- Laboratorio de Motores y Lubricantes:
 - observación y medida de huellas de desgaste en cojinetes u otros elementos sometidos a fricción;

- observación y medida de piezas de motor (camisas, pistones, segmentos, etc.), incluso con geometrías y tamaños que dificulten el acceso a las zonas de interés;
 - medida de perfiles de superficies y piezas en general (perfilometría);
 - estudio de comportamiento de inyectores; oclusión de orificios, alteración de agujas, etc.
 - medidas cuantitativas de dureza: determinación de volumen de rebabas, acuñaciones (“identaciones”), etc.;
 - interacción de lubricantes con las superficies: interfases;
 - dispersión de micelas u otros componentes en lubricantes;
 - estudio de procesos de corrosión.
- Especialidades y Asfaltos:
 - diseño de tintas: seguimiento del tiempo de secado, impregnación del sustrato, etc;
 - barnices, adhesivos, etc.: interacciones e interfases;
 - medición de la capacidad de mojado y humectabilidad de líquidos.
 - Estudio de emulsiones acuosas o en otros medios: medida “in situ” de micelas, grado de dispersión, etc.
 - medida de porosidades de áridos u otros sustratos.
 - observación y cuantificación de la interacción de betunes y áridos u otros componentes.

- Combustibles y Refino:
 - procesos de corrosión;
 - formación de emulsiones o precipitación/cristalización de parafinas, FAME, asfaltenos, etc. “in situ” (sin eliminación de la matriz);
 - observación de bacterias, algas u otros seres vivos “in vivo”.
 - medida de poros en catalizadores.
- Polímeros:
 - medición de multicapas, inclusiones, inhomogeneidades, etc. sin corte;
 - observación y medición de test de arañazos y otros efectos estéticos;
 - materiales autorreparables: medición de entallas, impactos, vesículas de reparador, etc.
 - interacciones e interfases en materiales compuestos (films de polímero sobre papel, metal, etc.; materiales reforzados...) sin corte.
 - acabado (“finishing”) de superficies, polímeros adhesivos.
- Geología:
 - interacciones roca-fluido: observación de interfases,
 - observación y medición de porosidad de rocas;
 - observación y medición de inclusiones fluidas o sólidas.

En los siguientes apartados, se hará especial mención a las aplicaciones más utilizadas en cada uno de los equipos, describiendo algunos de los ensayos realizados con los mismos.

6.2 Aplicaciones del Sistema de microscopía confocal para materiales Leica DCM 3D

6.2.1 Medición de huellas de ensayo HFRR en rodamientos

La lubricidad es la capacidad de reducción de desgaste que puede proporcionar un lubricante. Puede medirse, entre otros métodos, por la huella producida en un rodamiento (bola) oscilante en contacto con una placa fija, sumergidas ambas en un fluido.

El objeto del ensayo HFRR (*High Frequency Reciprocating Rig*) es evaluar las propiedades lubricantes de los combustibles diésel y de diversos aceites, incluidos aquellos que contienen aditivos mejoradores de lubricidad, con el objetivo de estimar la capacidad del combustible o aceite, de minimizar el desgaste de los equipos de inyección, usados en automóviles y aplicaciones similares.

El procedimiento se realiza en un recipiente que se mantiene a una temperatura prescrita. Una bola de acero se sujeta en firme en un porta-bolas dispuesto en vertical y, aplicando una carga, presiona sobre una placa fija de acero colocada en horizontal. La bola de ensayo se hace oscilar con una frecuencia y longitud de carrera determinadas, manteniendo la superficie de contacto con la placa totalmente sumergida en el fluido. Se especifican las características de la bola y de la placa, temperatura, carga aplicada, frecuencia y longitud de carrera. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad durante el ensayo sirven para corregir a condiciones ambientales estándar el tamaño de la huella de desgaste, producida en la bola de ensayo. El diámetro corregido de la huella de desgaste es una medida de la lubricidad del fluido (ISO 12156-1).

A continuación, en la figura 16 se muestra un esquema del sistema descrito, y en la tabla XII y figura 17, las condiciones en que debe realizarse el ensayo y las condiciones del aire en la habitación respectivamente.

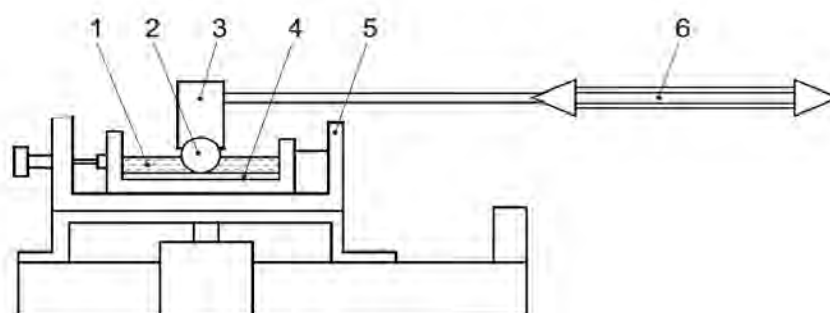


Figura 16. Ejemplo de dispositivo con movimiento alternativo de alta frecuencia. 1- Recipiente del fluido, 2-Bola de ensayo, 3-Masa de ensayo, 4-Placa de ensayo, 5-Baño de calentamiento, 6-Movimiento alternativo.

Parámetro	Valor
Volumen del fluido, ml	$2 \pm 0,2$
Longitud de carrera, mm	$1 \pm 0,02$
Frecuencia, Hz	50 ± 1
Temperatura del fluido, °C	60 ± 2
Masa de ensayo (masa total, incluyendo los elementos de fijación), g	200 ± 1
Duración del ensayo, min	$75 \pm 0,1$
Área de la superficie del recipiente, mm ²	600 ± 100
Aire en el laboratorio	Véase la figura 17

Tabla XII. Condiciones del ensayo.

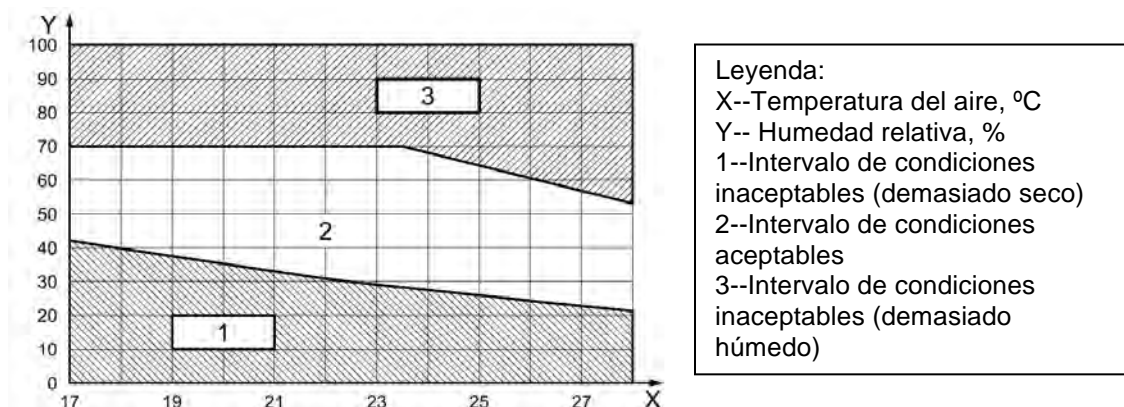


Figura 17. Condiciones del aire en el laboratorio.

El aspecto de la huella de desgaste del rodamiento, puede variar con el tipo de combustible, especialmente si contiene aditivos mejoradores de la lubricidad. Normalmente, la huella de desgaste aparece como una serie de rasguños en la dirección del movimiento de la bola (considerado eje x).

En algunos casos, por ejemplo, cuando se ensayan fluidos de referencia de baja lubricidad, la separación entre la huella y la zona descolorida (pero no rozada) es clara, y es fácil medir el tamaño de la huella. En otros casos, la parte central arañada de la bola está rodeada por una zona menos nítida, y no existe un límite definido entre las zonas rozada y no rozada de la bola. En estos casos, puede resultar más difícil distinguir o medir la verdadera forma de la huella (ISO 12156-1). En la figura 18, se muestran las zonas de una huella de desgaste.

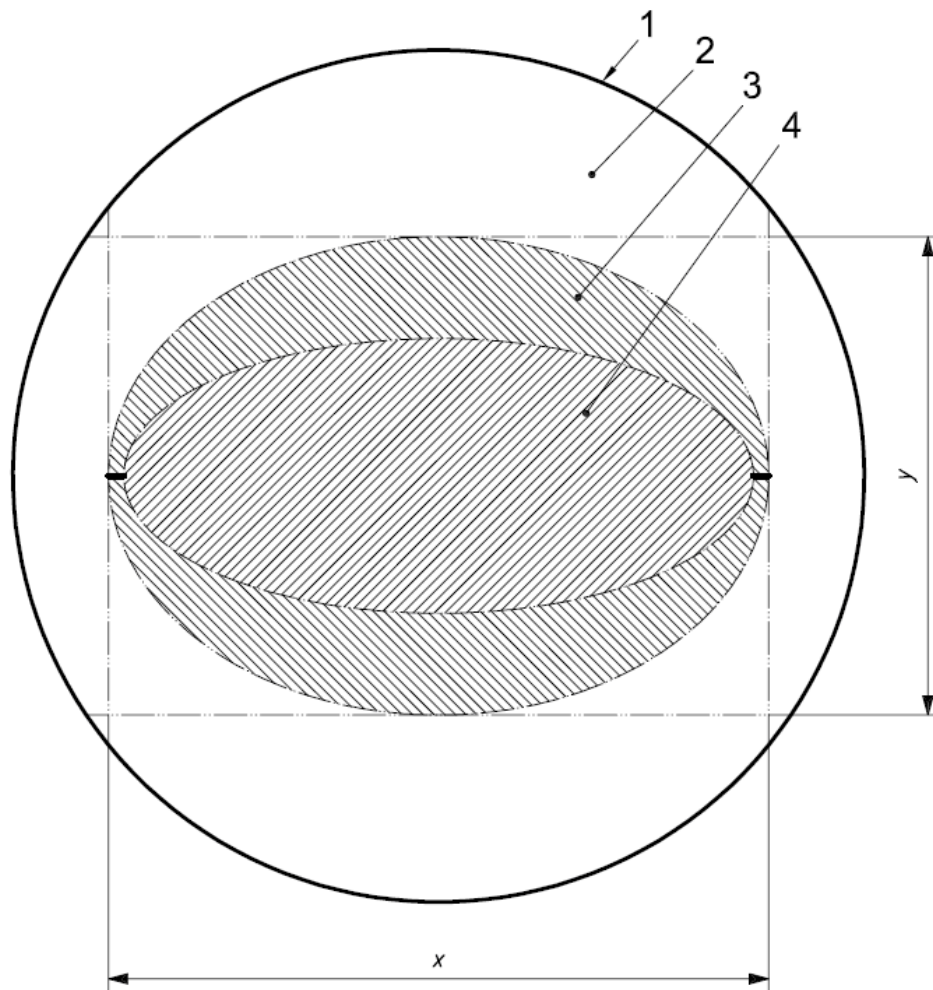


Figura 18. Ejemplo de una huella de desgaste con un contorno borroso. 1-Bola de ensayo (no está escalada), 2-Zona no rozada, 3-Zona rozada menos nítida, 4-Zona rozada.

Hasta ahora, tras la realización del ensayo, sólo se medía el diámetro de la huella en las direcciones X e Y. Con el DCM 3D, además de estos datos, se pueden obtener medidas de área y volumen, y así calcular la cantidad de materia perdida.

Además, el equipo es capaz de realizar una imagen 3D, gracias a lo cual se puede intuir visualmente cómo se ha ido produciendo la huella, y la relación entre la huella que aparece en el rodamiento y la que aparece en el disco sobre el que roza.

El primer paso en el procedimiento seguido para el análisis de las huellas de rodamientos y de sus respectivos discos, es la limpieza de sus superficies mediante heptano, para garantizar que no contienen ningún resto de lubricante que pueda distorsionar la medida.

Una vez limpias, se colocan las piezas en la platina del microscopio, que se desplazará en las direcciones X e Y para elegir la zona de la pieza en la que se desea realizar la medida.

Tras tener la pieza colocada, se procederá a la elección del objetivo, que dependerá de varios factores. En principio, cuanto mayor sea la apertura numérica de éste, mejor será la resolución de la imagen obtenida, sin embargo, la apertura numérica crece según va creciendo el aumento del objetivo y por tanto, reduciéndose el campo visual. Dado que para realizar las medidas es necesario obtener la imagen de la huella completa, si se eligiera un objetivo de gran aumento, para visualizar la pieza en detalle, sería necesario realizar un cosido de imágenes o “*stitching*”, que permitiera visualizar la huella completa, suponiendo este método un mayor tiempo de adquisición de la imagen. Por tanto, será necesario llegar a un compromiso, dependiendo de las necesidades.

La observación adquirida debe ser topográfica, para que el programa pueda realizar una reconstrucción en tres dimensiones, en la que posteriormente poder tomar medidas.

Como ya se definió en el capítulo 5 (apartado 5.1.2), el sistema de iluminación del equipo cuenta con dos leds, uno azul y otro blanco, que se elegirán dependiendo de las necesidades. El led azul tiene una longitud de onda (λ) menor que el led blanco, por lo que proporcionará mayor resolución, ya que según el criterio de Rayleigh, el límite de resolución será del orden de la longitud de onda utilizada en el proceso. La ecuación 1 muestra el valor del límite de resolución, siendo λ la longitud de onda y AN la apertura numérica del objetivo.

$$\varepsilon = 0,61 \frac{\lambda}{AN} \quad [1]$$

Sin embargo, a veces es necesario sacrificar algo de resolución para poder ver los colores reales de las superficies, ya que estos solo se pueden observar con el led blanco.

La iluminación, también debe ser la adecuada. La imagen puede considerarse correcta cuando el número de puntos medidos sea superior al 80% (normalmente el sistema es incapaz de leer todos los puntos, debido a inclinaciones o falta de luz, por lo que se han de reconstruir por interpolación, de la forma más aproximada posible). Si iluminamos demasiado la muestra, el microscopio será capaz de recoger más puntos de lectura, por lo que las medidas que después se realicen serán más fiables, ya que habrá menos puntos que hayan tenido que ser interpolados por el programa, sin embargo, la fotografía se verá muy saturada (quemada).

Una vez tomada la fotografía, ésta será transferida al software Leica Map para proceder a su análisis, en el que se deben seguir los siguientes pasos:

- Se debe extraer siempre la capa topográfica (figura 19, derecha), ya que es con la que se trabajará posteriormente para extraer los datos. En el caso en el que se desee ver la superficie en color real, además de la capa topográfica se extraerá la capa de la imagen (figura 19, izquierda).

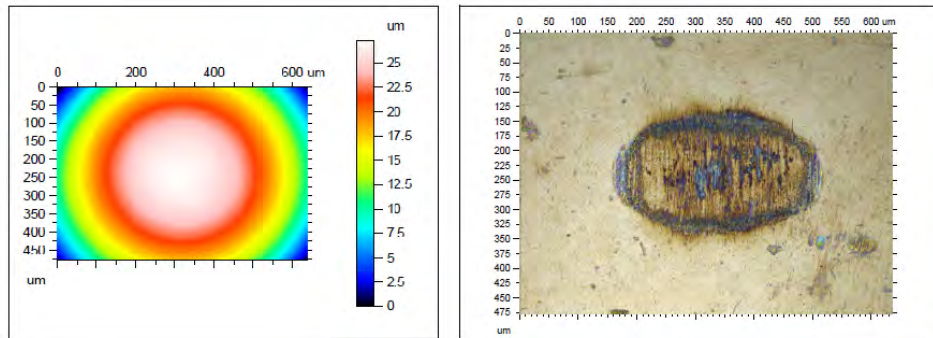


Figura 19. Imagen de la capa topográfica nivelada (izquierda) y de la capa de la imagen (derecha).

- Normalmente para obtener una imagen en tres dimensiones con escala de alturas habrá que realizar una rectificación de la forma de la pieza, es decir, nivelarla.
- En el caso en el que la pieza presente una forma determinada, como es el caso del rodamiento (forma esférica), es preciso proceder a la eliminación de la misma, mediante un algoritmo matemático adecuado. De esta manera, se obtiene una imagen tridimensional correctamente preparada para realizar mediciones. Como se puede observar en la figura 20 (derecha), es fácil apreciar la oquedad (huella) generado por el experimento.

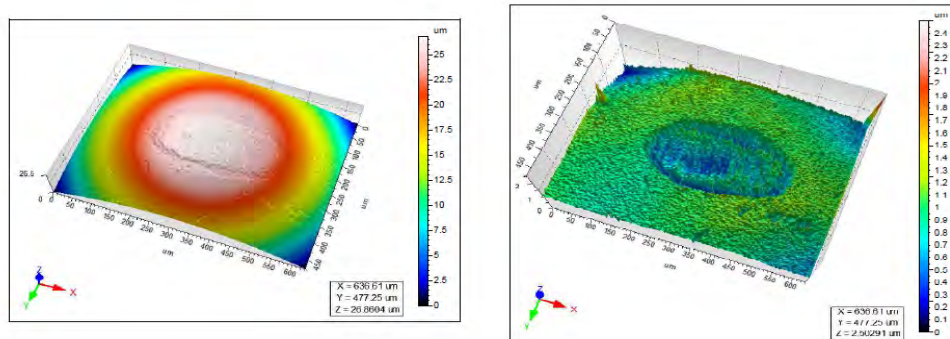


Figura 20. Imagen topográfica con escala de alturas en pseudocolor (izquierda). Imagen topográfica con supresión de forma (derecha).

- A partir de esta última imagen se pueden obtener perfiles, con sus respectivas medidas, tal y como se muestra en las figuras 21 y 22:

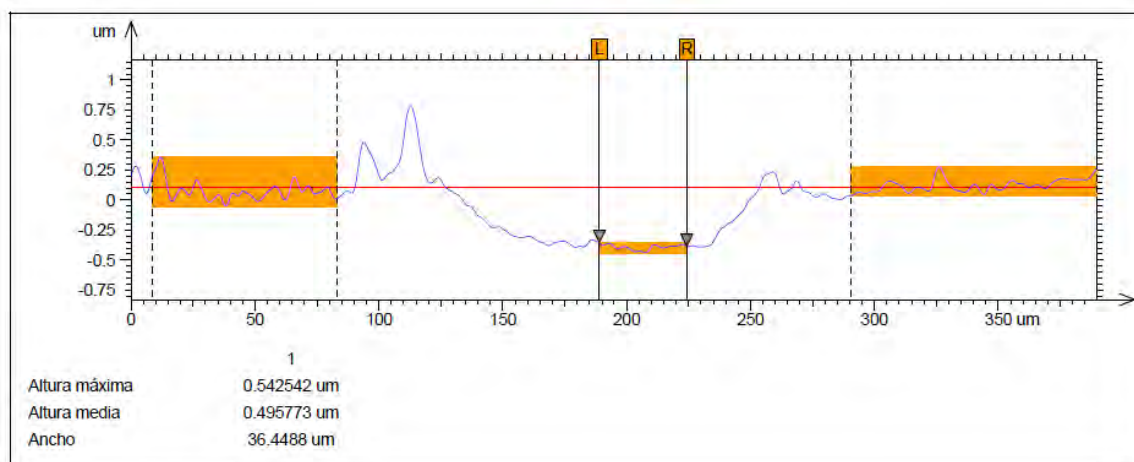


Figura 21. Medidas de alturas en el perfil del diámetro menor de la huella del rodamiento.

Los datos de alturas están referidos a la línea media (línea roja). En el perfil de la figura 21, se aprecia que el material, debido al proceso de fricción, se ha desplazado a los bordes de la huella. Además, si se observa la fotografía de la huella (figura 19 derecha), se aprecia un rayado en la misma dirección en la que se ha medido este perfil, de lo que se puede deducir, que el movimiento de la bola sigue esta dirección en el ensayo.

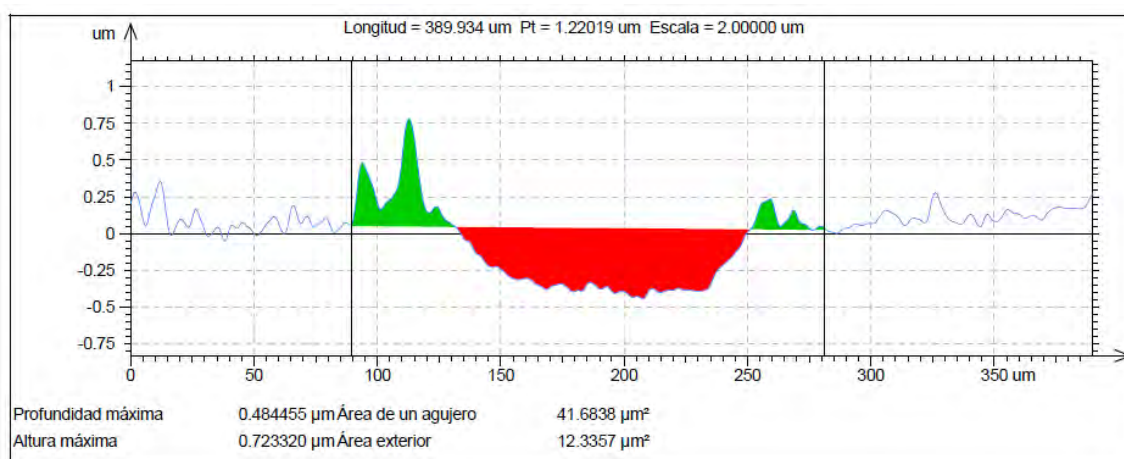


Figura 22. Medidas de áreas en el perfil del diámetro menor de la huella del rodamiento

- Se calcula el volumen de la huella, que se realiza perfil a perfil, considerando la superficie como una yuxtaposición de perfiles paralelos. Para cada perfil, se considera el área entre, por un lado, el fondo del hueco (huella) y, por otro, la recta entre los puntos de intersección del perfil y el contorno alrededor de la huella, dibujado manualmente con el ratón. La distancia a la que se dibuje este contorno manual, siempre que se trace por el exterior del borde de la huella, no será relevante para el cálculo del volumen, ya que tras haber realizado una rectificación y una supresión de forma de la pieza, todos los puntos exteriores a la oquedad tienen aproximadamente la misma cota y por tanto las superficies del contorno real y del contorno dibujado manualmente serán coincidentes. En la figura 23, se muestra la medida del volumen de la huella de un rodamiento.

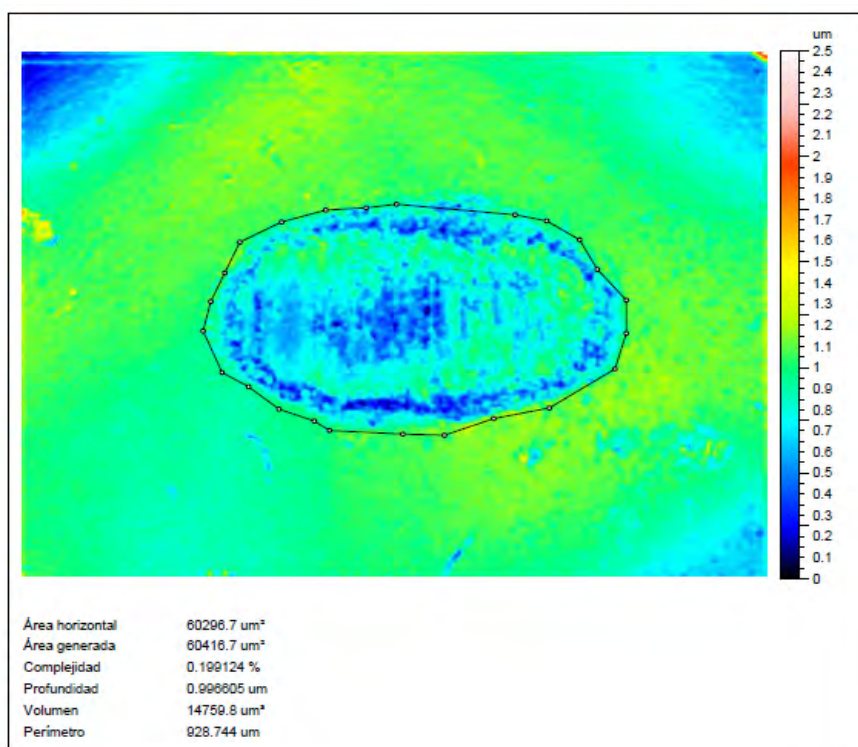


Figura 23. Volumen de la huella.

Hasta ahora, con los procedimientos que se venían realizando, se podía llegar a inferir que la longitud de la huella del rodamiento, no aumentaba progresivamente a medida que se aumentaba el tiempo del ensayo, sino que llegaba un punto en el que más o menos se mantenía constante, debido a que el rozamiento, cuando los componentes del ensayo están nuevos es mayor que tras haberse producido la huella. Esto es debido a que, a pesar de tratarse de superficies pulidas, presentan una rugosidad, que irá disminuyendo con el rozamiento y facilitando de esta forma la fricción.

Tras realizar varios ensayos de rodamientos y discos que nos proporcionaron del área de lubricantes, se observó que los datos obtenidos de los análisis, podían proporcionar nueva información de interés, hasta entonces no conocida. A continuación se presentan las nuevas deducciones:

1. La profundidad de la huella del disco es siempre mayor que la que se produce en el rodamiento, de lo que se deduce que el material del que está fabricado el rodamiento será más duro.
2. Se observa que el proceso de fricción produce un desplazamiento de material, creando una especie de montículos, rebabas, alrededor de la huella (apreciables en los perfiles de ésta).
3. Se aprecia una relación entre las huellas del rodamiento y del disco, coincidiendo las medidas de la huella del rodamiento en su eje mayor, y la del disco en su eje menor.
4. Se puede conocer la cantidad de material desplazado por el rozamiento, ya que el programa facilita datos de profundidades, áreas y volúmenes.
5. Se puede observar la imagen de la superficie en color real, distinguiendo así, las diferentes zonas (en la que se produce el rozamiento y la que ha sido afectada sólo térmicamente).
6. Se puede extraer una imagen en tres dimensiones facilitándose, de esta forma, la comprensión de la superficie.

6.2.2 Medición de huellas de cojinetes de biela debidas al efecto de la cavitación

Los cojinetes de biela, son casquillos alojados en la cabeza de la biela, sobre los que se soporta y gira la muñequilla del cigüeñal. Se utilizan para permitir la transmisión de carga y par, además de reducir la fricción e inhibir el desgaste entre dos piezas que tienen movimiento relativo entre sí. En los motores de combustión interna, su uso contribuye, de manera substancial, a la mejora de la eficiencia, ya que se obtienen beneficios tales como, un mejor aprovechamiento de combustible, menor consumo de aceite, reducción de emisiones contaminantes y disminución en gastos de mantenimiento.

A continuación, en la figura 24, se muestra la imagen de una biela con sus componentes principales, distinguiéndose entre ellos los cojinetes.



Figura 24. Componentes de una biela.
(Descripción del motor y su funcionamiento)

Entre el eje y el cojinete se tiene una delgada película lubricante, la cual impide el contacto entre metales, limitando la fricción. Dicha película también funciona como refrigerante, al contribuir en la transferencia de calor, y como amortiguador, ya que absorbe los impactos causados por vibraciones y cargas variables, las cuales son típicas en motores de combustión interna.

El laboratorio de motores quiere conocer qué diferencia existe en el desgaste de la superficie de estos cojines debido al efecto de la cavitación, en función de lo que varía la holgura de paso de lubricante con el bulón.

La cavitación fue explicada por primera vez por Lord Rayleigh en 1917, y puede definirse como un efecto hidrodinámico que se produce cuando durante el flujo de un fluido existan caídas de presión que puedan alcanzar valores del orden de la presión de vapor del líquido en la temperatura de trabajo, provocándose de esta forma, la nucleación de pequeñas burbujas de vapor.

Estas burbujas son llevadas por el flujo y al alcanzar regiones de mayores presiones sufren un colapso violento y caótico que genera altas presiones y velocidades en las regiones próximas al colapso. Estas altas presiones y velocidades que surgen del colapso, provocan el desgaste de superficies sólidas próximas. Es decir, el desgaste por cavitación se puede definir como aquel daño que ocurre en los materiales debido al crecimiento y colapso de pequeñas burbujas que surgen debido a las variaciones de presión durante el flujo de un fluido.

El colapso se da de manera tan rápida que parte del vapor presente en la burbuja no tiene tiempo suficiente de condensarse. Así, el vapor (y también cualquier gas disuelto) será comprimido a una alta presión que, eventualmente, será suficientemente alta para interrumpir el colapso y hacer que la burbuja crezca nuevamente de forma explosiva, emitiendo ondas de presión o de choque, conforme se esquematiza en la figura 25.

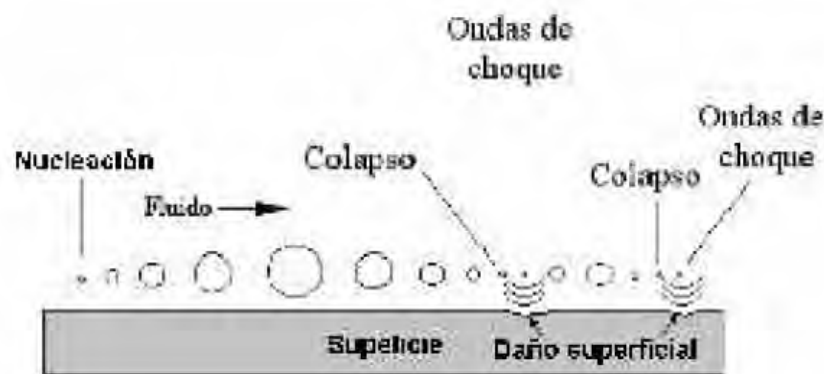


Figura 25. Representación esquemática del fenómeno de nucleación y colapso de micro-burbujas y la emisión de ondas de choque.

(Desgaste de materiales)

Las ondas de presión emitidas durante el crecimiento explosivo de las burbujas son las responsables del daño del material. Estas ondas de choque, que generan elevadísimas presiones, son capaces de alcanzar valores del orden de GPa, y actúan en un intervalo de tiempo muy corto, sometiendo al material a una tasa de deformación muy alta.

Con la continuación del colapso, hay una aceleración de la burbuja y por consiguiente la formación de un micro-chorro, siendo este otro mecanismo de daño posible además de las ondas de presión.

En la figura 26, se muestran los cojinetes correspondientes a holguras desde 29 μm hasta 59 μm , apreciándose claramente las diferencias de las huellas que aparecen en ellas.

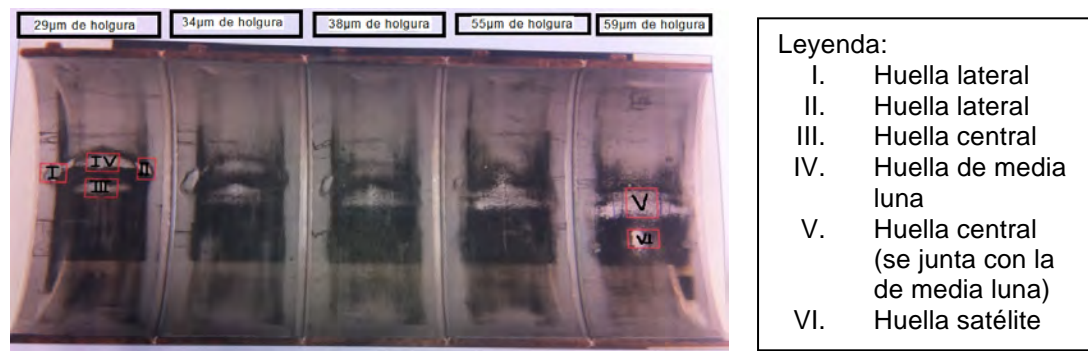


Figura 26. Fotografía de las diferentes huellas producidas en los cojinetes, en función de la holgura.

Se realizan medidas a todas las huellas de los cojinetes, para lo cual, en primer lugar, se procede a la limpieza de las superficies, con heptano, para eliminar posibles restos de aceite y garantizar de esta forma una medida correcta.

Una vez limpios, los cojinetes se colocan en el sombrerete de una cabeza de biela, que a su vez, se sujeta mediante un banco de trabajo, asegurando así que no exista ningún tipo de movimiento o vibración que pueda desvirtuar la medida. El banco de trabajo se coloca sobre la platina del microscopio, la cuál será desplazada en las direcciones X e Y hasta encontrar la zona de la pieza en la que se va a realizar la medida.

En el caso de los cojites, a diferencia de los rodamientos descritos anteriormente, las huellas que presentan son grandes, y por tanto, no es posible recoger una imagen en la que aparezca toda la huella, ni siquiera utilizando el objetivo de menor aumento de que se dispone (5x).

Para recoger completamente el agujero o huella de desgaste, es necesario realizar un cosido de imágenes o “stitching”, seleccionando en el microscopio la opción de medida topográfica extendida e introduciendo las dimensiones que se desean medir en la opción de enlazado, y realizando un barrido por la muestra para recoger diferentes planos verticales y poder reconstruir después la imagen en 3D.

La elección del objetivo es una tarea complicada, ya que los cojinetes presentan una forma semicilíndrica, haciendo muy difícil realizar medidas con objetivos superiores a 10 aumentos de corta distancia de trabajo. El problema que se presenta, es que la forma de la pieza imposibilita el movimiento del objetivo para realizar la medida de forma correcta, ya que éste puede chocar con la pared curvada del cojine.

Existen varias formas de subsanar este problema. La primera y más simple es utilizar objetivos de pequeña magnificación (5x, 10x), cuya distancia de trabajo sea lo suficiente para que el objetivo pueda moverse por la pieza para realizar la medida, sin que choque con los laterales de la ésta. Sin embargo, como ya se explicó en el caso de los rodamientos, cuanto menor es la magnificación, también menor será la apertura numérica y por tanto la resolución del objetivo.

Otra opción es utilizar objetivos de mayor magnificación, pero de larga distancia de trabajo (50x de larga distancia de trabajo). El problema que se presenta en este caso, es el tiempo que tarda en recoger la imagen, que aumentará bastante con respecto a los objetivos de menor aumento, ya que el campo recogido en cada barrido es mucho menor. Los objetivos de larga distancia de trabajo, contienen lentes modificadas para poder trabajar a bastante distancia de la muestra con aumentos elevados, sin embargo, al realizar la modificación de la lente se pierde apertura numérica, y por tanto, este tipo de lente siempre tendrá peor resolución que su homóloga de corta distancia de trabajo. Normalmente, al trabajar con este tipo de lentes conviene saturar ligeramente la imagen, para que el número de puntos leídos por el microscopio sea mayor.

El objetivo (de los que se tienen disponibles en el CTR) que se adapta mejor para esta aplicación, es el de 20x ($AN=0,5$), con el que se obtiene una resolución aceptable, y los aumentos no son excesivamente altos, por lo que no tardará demasiado en recoger la imagen, sin embargo, la distancia de trabajo de este objetivo es tan solo de 1,27 mm, por lo que en algunos casos será imposible utilizarlo.

En el caso de esta pieza, lo más importante son las medidas que se realizarán en el software de análisis tras haber recogido la imagen, por lo que en este caso, puede ser bueno saturar la imagen, obteniendo una fotografía un poco “quemada”, pero también mayor número de puntos medidos, de esta forma, el programa tendrá que realizar menos interpolaciones matemáticas y la medida será más exacta.

En los casos en los que no sea necesario visualizar la superficie de la pieza en color real, será mejor utilizar el led azul, ya que su longitud de onda es menor que la del blanco y por tanto, se obtendrá mejor resolución.

Una vez tomada la fotografía, ésta será transferida al software Leica Map para proceder a su análisis. De igual forma que en el caso de los rodamientos, se extraerá la capa topográfica (figura 27, izquierda), ya que es sobre la que se trabajará para extraer los datos. También se puede obtener la capa de la imagen (figura 27, derecha), para visualizar una fotografía de la superficie en color real (sólo en los casos en los que en la captura de la imagen se haya realizado con el led blanco).

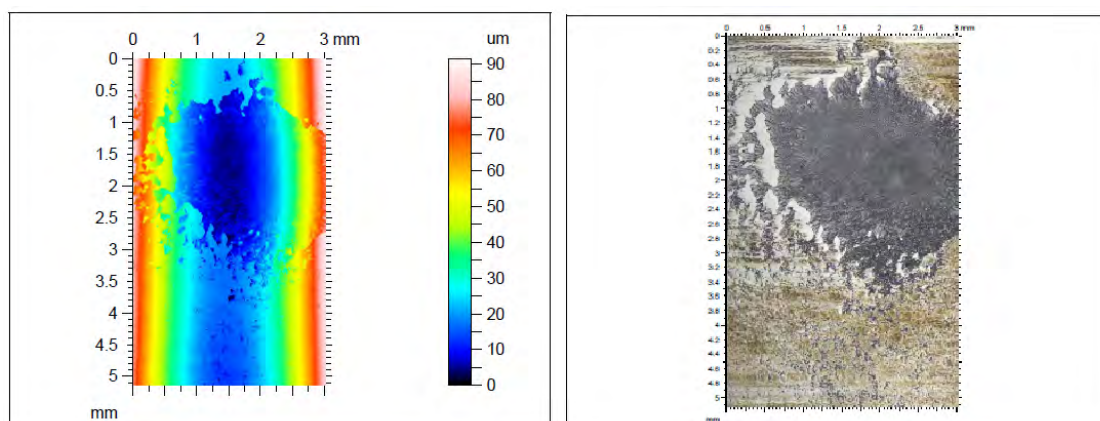


Figura 27. Imagen de la capa topográfica nivelada (izquierda) y de la capa de la imagen (derecha), realizadas ambas con un objetivo de 20x.

Para que la escala de alturas sea correcta, será necesario realizar una rectificación de la imagen, para nivelarla.

Debido a los problemas, que se han descrito anteriormente, en la elección del objetivo, en muchos casos, la imagen que recoja el software de captura (LeicaSCAN), tendrá bastantes puntos negros, o puntos donde el microscopio no es capaz de realizar una lectura (ya sea por la iluminación, por la existencia de pendientes...). Debido a esto, será necesario completar estos puntos mediante aproximaciones matemáticas para obtener una imagen completa (sin huecos).

La pieza presenta forma de casquete semi-cilindrico, por lo que habrá que suprimir esta forma con un algoritmo matemático, para poder obtener así, una imagen tridimensional adecuada para realizar mediciones, (figura 28, derecha).

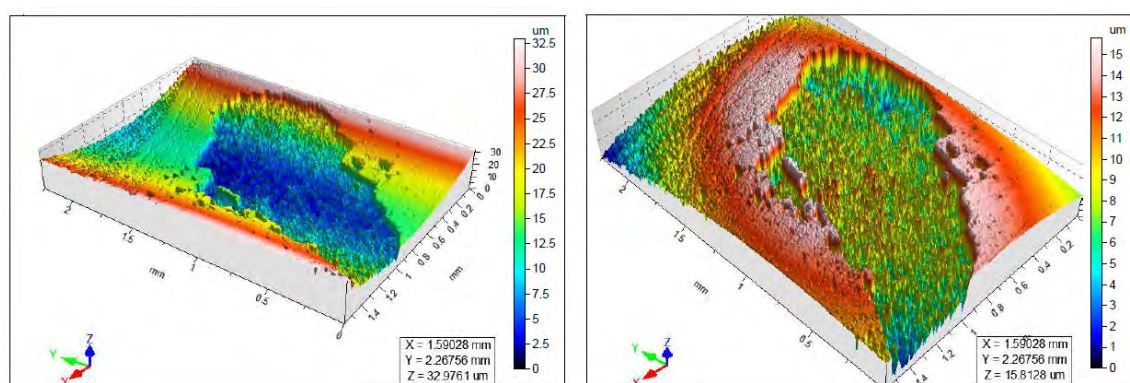


Figura 28. Imagen topográfica con escala de alturas en pseudocolor (izquierda). Imagen topográfica con supresión de forma (derecha). Realizadas ambas con un objetivo de 20x

A partir de esta última imagen, se pueden obtener perfiles, con sus respectivas medidas. En la figura 29, se muestran las medidas de profundidad, altura media y máxima de la huella, y en la figura 30, el área del agujero.

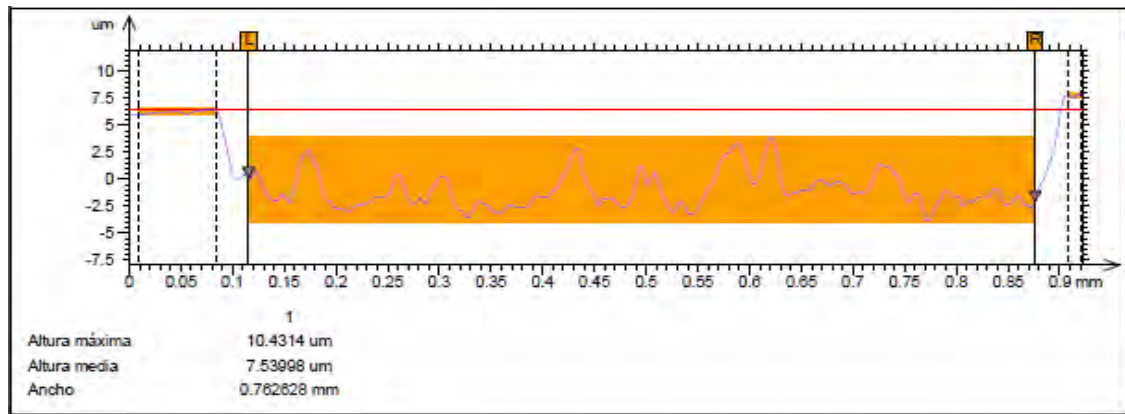


Figura 29. Medidas de alturas en un perfil de la huella del cojinete.

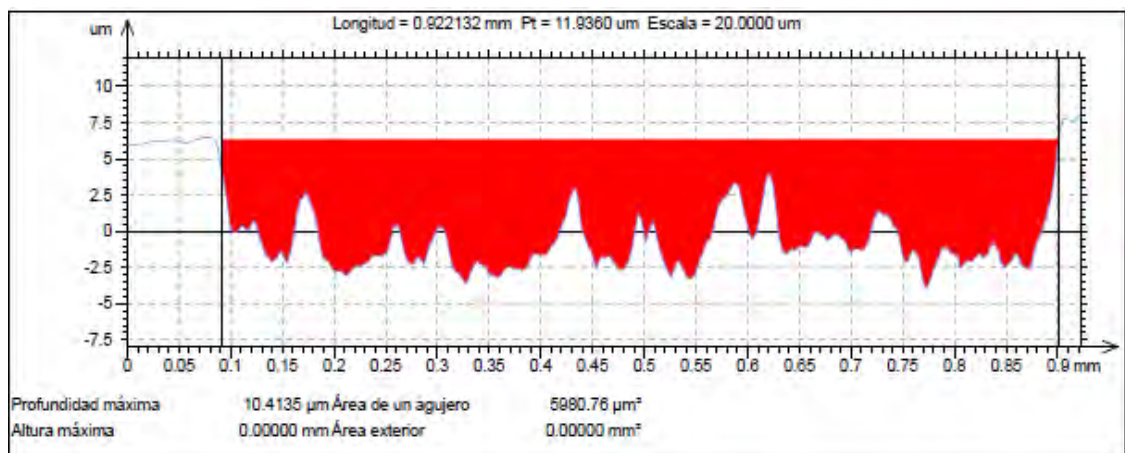


Figura 30. Medidas de áreas en un perfil de la huella del cojinete.

El volumen de la huella, se calcula de la misma manera que en el caso de los rodamientos, perfil a perfil, considerando la superficie como una yuxtaposición de perfiles paralelos. Para cada perfil, se considera el área entre, por un lado, el fondo del hueco y, por otro, la recta entre los puntos de intersección del perfil y el contorno dibujado manualmente con el ratón. En la figura 31, se muestra esta medida.

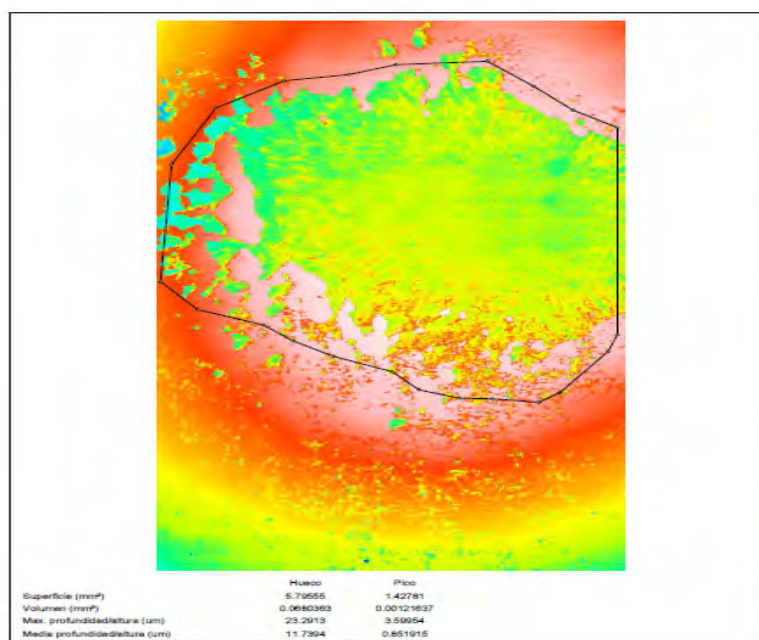


Figura 31. Volumen de una de la huellas del cojinete realizada con un objetivo de 20x.

En las imágenes anteriores, no aparece la huella completa, debido a que la geometría de la pieza dificulta la captura, debido a la falta de espacio para desplazar el objetivo. A continuación, en la figura 32, se muestra la medida de volumen de una huella lateral recogida con el objetivo de 10x, con el cual, es más fácil y rápido conseguir medidas de superficies mayores, aunque se sacrifica resolución.

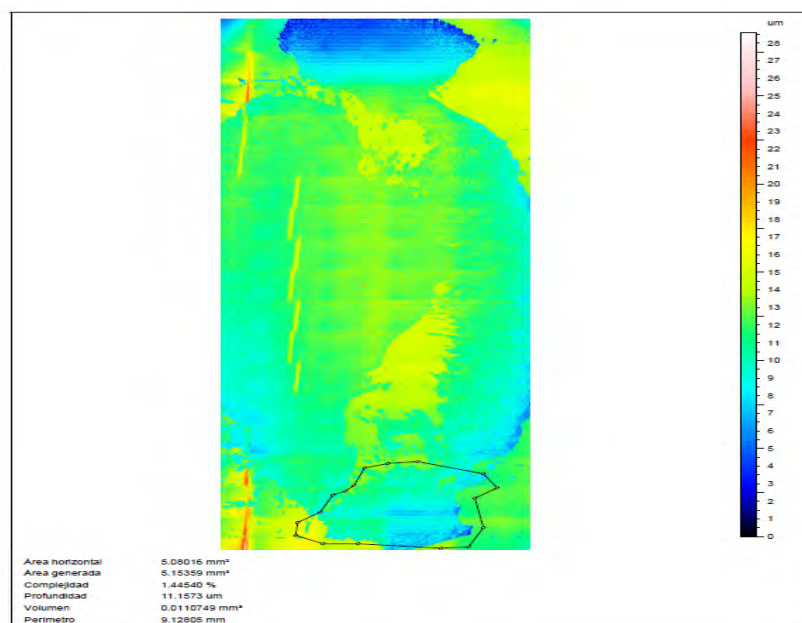


Figura 32. Imagen de la huella completa de un cojine, realizada con un objetivo de 10x, en la que se mide el volumen de una de las huellas laterales.

Hasta ahora, la forma de conocer la cantidad de material desprendido en función de las diferentes holguras de paso de aceite en los cojinetes, era haciendo estudios de la masa que éstos perdían. De esta forma, sabían que para holguras menores, la masa perdida por los cojinetes era menor, por lo que deducían que las huellas eran menores.

Tras realizar los análisis con el nuevo microscopio confocal, se observó, que los datos obtenidos de los análisis, podían proporcionar nueva información de interés, hasta entonces no conocida. A continuación se presentan las nuevas deducciones:

1. Es posible observar perfiles, gracias a los cuales se puede conocer la profundidad media de cada una de las huellas. Gracias a este dato, se pudo observar que a medida que se aumentaba la holgura de paso de aceite, las huellas eran más grandes, pero no más profundas. La profundidad de las huellas no dependía de la holgura, sino que, en todos los casos, tenía valores similares, pudiendo llegar así a la conclusión de que se desprendía únicamente la capa superficial de los cojinetes.
2. En algunas de las fotografías en color real realizadas a las huellas era posible distinguir la orientación o patrón de la textura de la superficie, la cual, está determinada por el método de manufactura utilizado para crear la superficie. De esta forma, se corrobora la hipótesis anterior de que los cojinetes poseen un recubrimiento, que es el que se pierde debido al efecto de la cavitación.
3. La forma de la huella que aparece en el cojinete depende de la holgura. Cuando ésta es pequeña se aprecia más pérdida de material en los extremos, mientras que cuando es grande la zona más dañada es la llamada “huella satélite”.
4. Se puede conocer la cantidad de material perdido, ya que el programa facilita datos de profundidades, áreas y volúmenes.
5. Se puede extraer una imagen en tres dimensiones facilitándose, de esta forma, la comprensión de la superficie.

6.2.3 Medición de distancia entre capas en polímeros multicapa.

Los films y láminas multicapa, también denominados complejos, incluyen aquellos materiales flexibles que se han obtenido por la combinación de dos o más películas de materiales simples. Dichas estructuras multicapa pueden obtenerse por distintos procesos; cuando la estructura se compone sólo por materiales termoplásticos se utiliza una técnica de coextrusión de los distintos materiales poliméricos. Otro proceso de obtención de films complejos multicapa, consiste en tecnología de laminación por adhesivos para combinar sustratos de diferente naturaleza, como por ejemplo films termoplásticos con papel o lámina de aluminio. (Sanz)

El diseño base de un film multicapa consiste en una estructura, generalmente simétrica, formada por una capa externa de material que aporta propiedades estructurales (poliamidas, poliésteres), una capa central de material que constituye la capa barrera (etilen-vinil-alcohol, cloruro de polivinilideno), y una capa interna de material con buena sensibilidad (polietileno, ionómeros).

El caso de estudio, fue un polímero tricapa (polietileno-adhesivo sensible a la presión- polietileno) y otro bicapa (polietileno-poliamida), en los que se intentó medir el espesor de las diferentes capas, aprovechando las diferencias en el índice de refracción.

Los picos que aparecen en el perfil de las figuras 33 y 34, muestran donde se produce un cambio en el índice de refracción, siendo el primero entre el aire y la muestra, el segundo representa la interfase entre los dos polímeros, siendo por esto un pico más débil ya que los índices de refracción de los polímeros son más similares, y el tercero representaría el cambio de índice entre la última capa de polímero y el papel sobre el que está apoyado para realizar la medida.

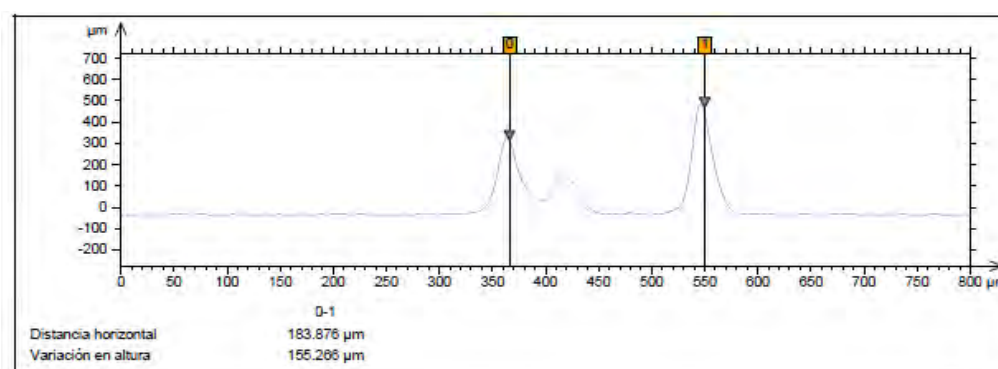


Figura 33. Perfil del espesor de un polímero bicapa (PE-PA).

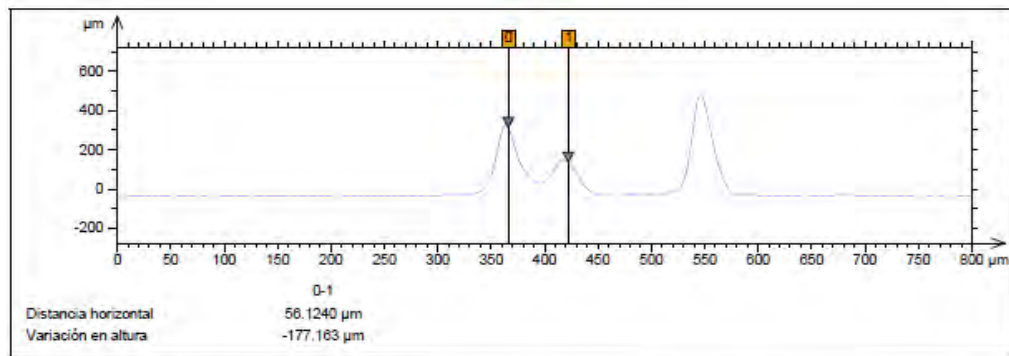


Figura 34. Perfil del espesor de las capas en un polímero bicapa (PE-PA).

Como se puede observar, se diferencian con claridad tres picos, siendo la distancia entre el primero y el tercero de aproximadamente 184 μm , (espesor total del film), y entre la primera y la segunda 56 μm (grosor de la primera capa). Siendo, por tanto, el espesor de la segunda capa aproximadamente de 128 μm .

Gracias a este estudio, se puede saber el número de capas y el espesor que existe entre ellas en un material lo suficientemente transparente como para que el equipo sea capaz de penetrar a través de estas capas. La mayor ventaja, es que para conocer este tipo de datos, no es necesario modificar la muestra, por lo que los datos obtenidos serán muy fiables. El problema que se presenta es que el DCM 3D, sólo es capaz de diferenciar entre dos o tres capas, si el polímero tuviera más capas, sería necesario utilizar el SP8.

6.2.4 Otras aplicaciones con el DCM 3D

INYECTORES DE DIESEL

El inyector es parte del sistema de inyección de combustible, cuya función es introducir una determinada cantidad de combustible, en forma pulverizada, en la cámara de combustión, distribuyéndolo lo más homogéneamente posible dentro del aire contenido en la cámara. En la figura 35 se muestra una fotografía de inyectores diesel.



Figura 35. Imagen de inyectores diesel

En muchos casos, los gasóleos presentan suciedad o residuos, por lo que los inyectores pueden ir acumulando suciedad, llegando incluso a producir la obstrucción de los orificios de inyección. Esta obstrucción también puede producirse por inquemados.

Con el DCM 3D es posible visualizar la superficie del inyector en tres dimensiones, en la que se pueden apreciar claramente los orificios de inyección, proporcionando una estimación del estado de los mismos. En la figura 36, se muestra una imagen en pseudocolor de la cabeza de un inyector de diésel.

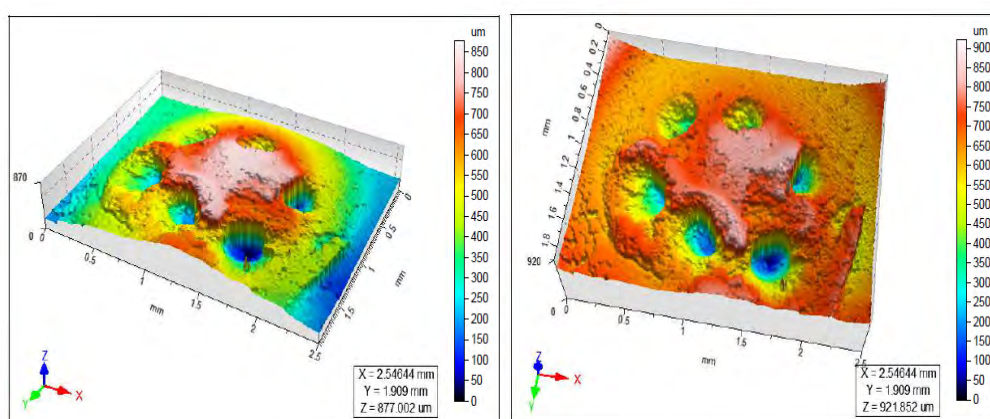


Figura 36. Superficie de la cabeza de un inyector de diesel en pseudocolor (izquierda) y con supresión de forma (derecha).

Además se puede realizar un estudio, para cuantificar la profundidad de los orificios, o su volumen, pudiendo realizar una comparativa entre un inyector nuevo y otro usado, para conocer el grado de obstrucción que se produce en éste al ser usado en determinadas condiciones. En las figuras 37, 38 y 39, se se puede observar el perfil de algunos de estos orificios, obteniendo su profundidad, su área y su volumen.

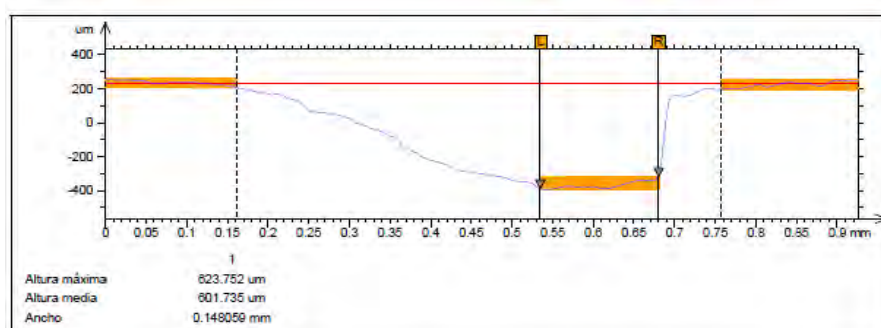


Figura 37. Altura máxima y media de un orificio de un inyector diesel usado

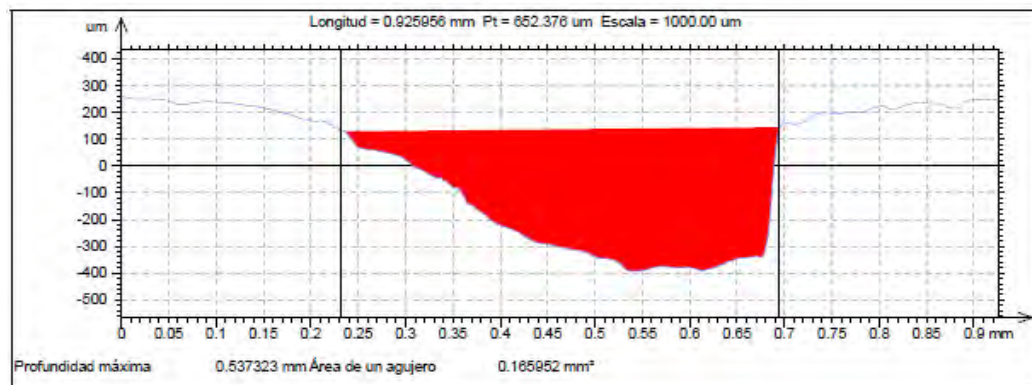


Figura 38. Área de un orificio de un inyector diesel usado.

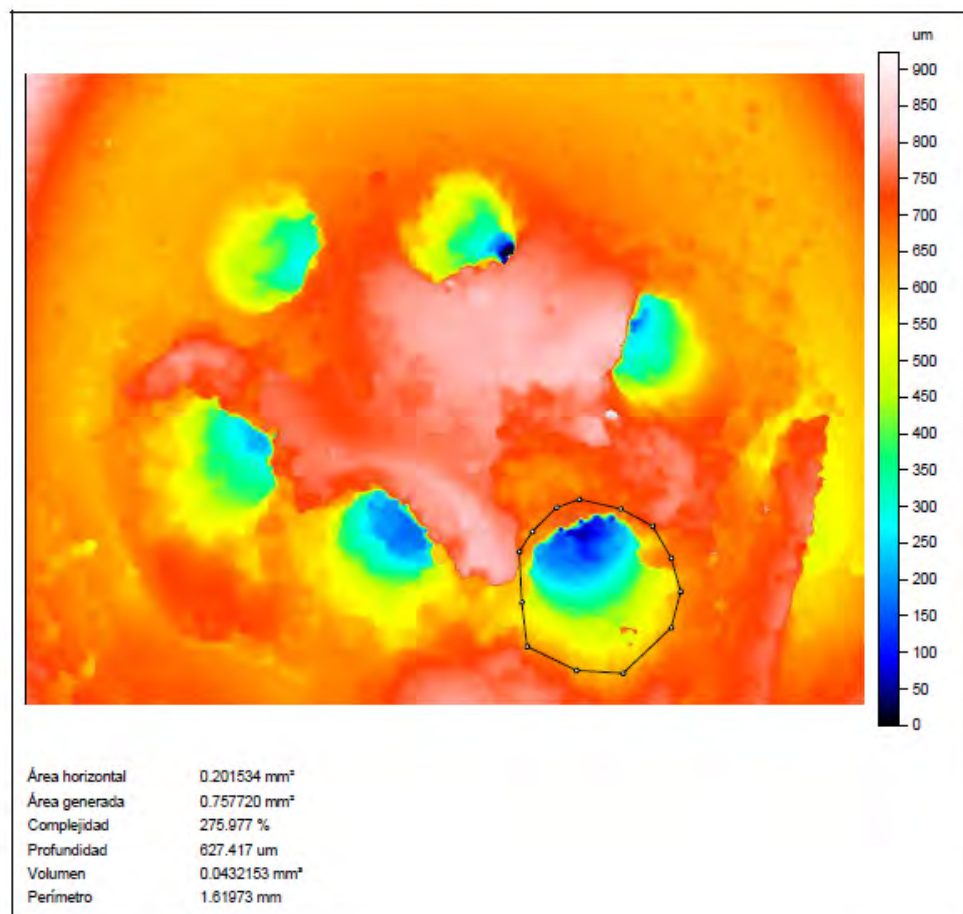


Figura 39. Volumen de un orificio de un inyector diesel usado.

JUNTAS DE PIEZAS MECÁNICAS

Una junta mecánica o de estanqueidad es un material adaptable que se utiliza para sellar adecuadamente la unión de las caras mecanizadas, y en general cualquier elemento hidráulico y/o neumático o en la conducción de cualquier otro fluido o sólido. En la figura 40 se muestra una fotografía de una junta de teflón y carbono.



Figura 40. Junta de teflón y carbono (tipo gráfico y fibra de carbono)

En este caso, se realiza un estudio de una junta cuyos componentes son teflón y carbono (tipo gráfico y fibra de carbono). Se pretende realizar un estudio comparativo entre una junta nueva y otra usada, para ver si es posible explicar el motivo de la ruptura de éstas. A continuación, en las figuras 41 y 42, se muestran las superficies de las juntas nuevas y tras haber sido usadas. En la usada, se distingue claramente una de las fibras de grafito y la grieta que presenta el material bajo esta.

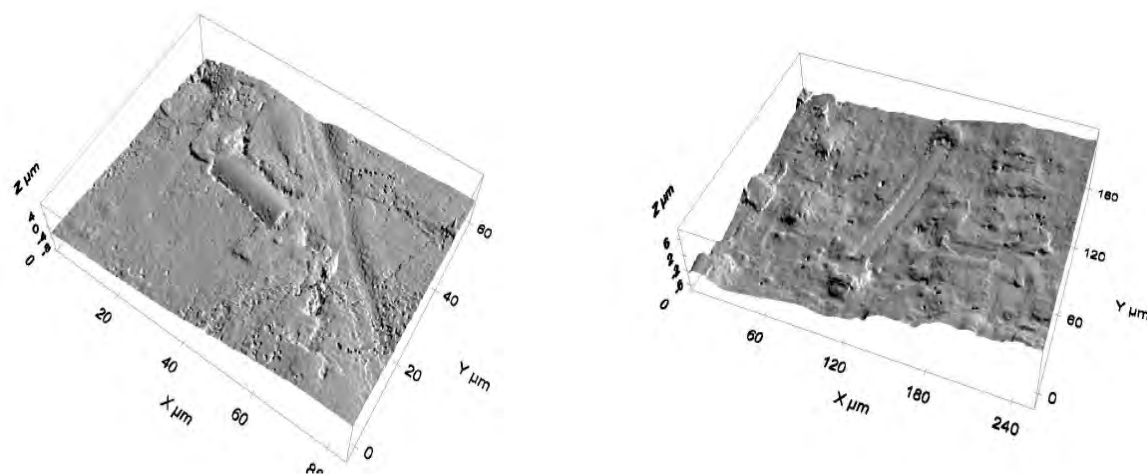


Figura 41. Superficie de la junta sin usar

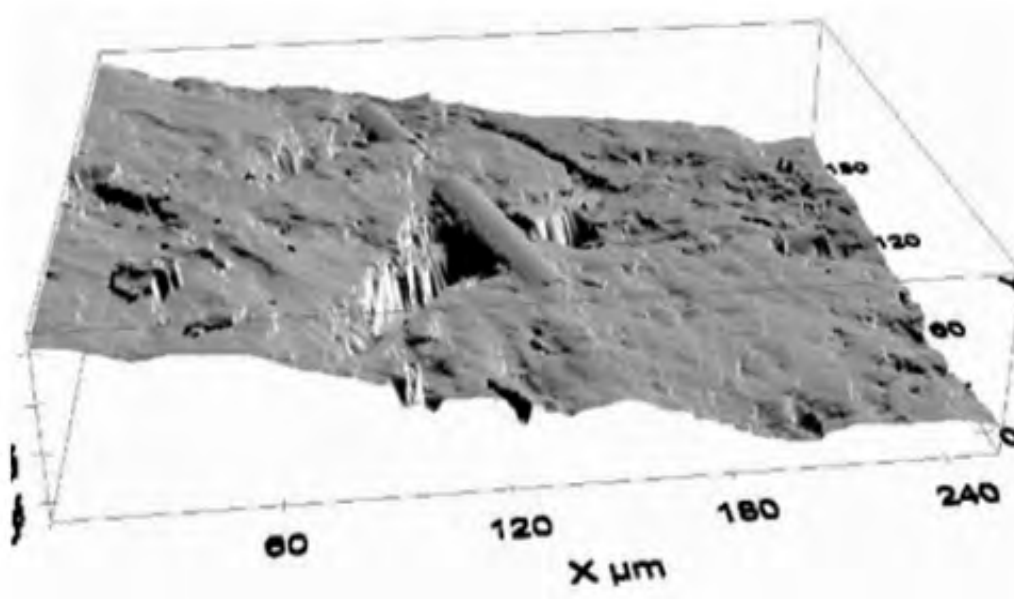


Figura 42. Superficie de la junta usada

Con este estudio se pudo concluir, que la rotura del material se debía a las fibras, pudiendo ser por un tamaño inadecuado de las mismas o por una mala inserción de éstas en el material base (teflón), provocando de esta forma grietas que llevan a la rotura del material.

6.3 Aplicaciones del Sistema de microscopía confocal espectral TCS-SP8 con microscopio invertido DMI6000CS

6.3.1 Inclusiones Fluidas

El crecimiento de cristales a partir de un fluido hidrotermal puede llegar a atrapar gases o líquidos dentro de imperfecciones de la estructura cristalina, al formarse cavidades que se cierran y quedan selladas a medida que el cristal sigue creciendo. Consecuentemente, las inclusiones fluidas ocupan cavidades microscópicas que quedan dentro de minerales depositados a partir de una solución hidrotermal, pudiendo contener distintas fases, líquidos, sólidos y/o gases.

De las inclusiones fluidas se puede obtener información como la temperatura y presión a la cual se formó el mineral que las contiene, así como el tipo y la densidad del fluido del cual están formadas.

Hasta ahora, la forma de estudiarlas era realizando secciones finas pulidas por ambos lados, para poder observarlas después en un microscopio óptico. Las fotografías que se podían observar eran similares a la que se presenta en la figura 43.

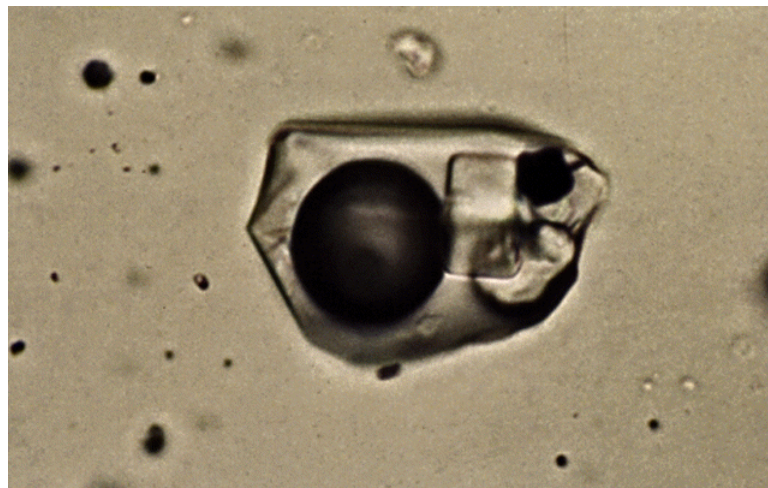


Figura 43. Inclusión fluida observada con un microscopio óptico convencional.

(Inclusión fluida)

Con el nuevo equipo, se puede observar de forma única la inclusión que se quiera analizar, mostrando ésta en tres dimensiones y pudiendo así cuantificar su volumen (volumen de líquido frente a volumen de gas). La parte interior de la inclusión, que puede apreciarse en las fotografías 43 y 44, se corresponde con el gas ocluido, siendo la otra parte un compuesto orgánico (que presenta fluorescencia).

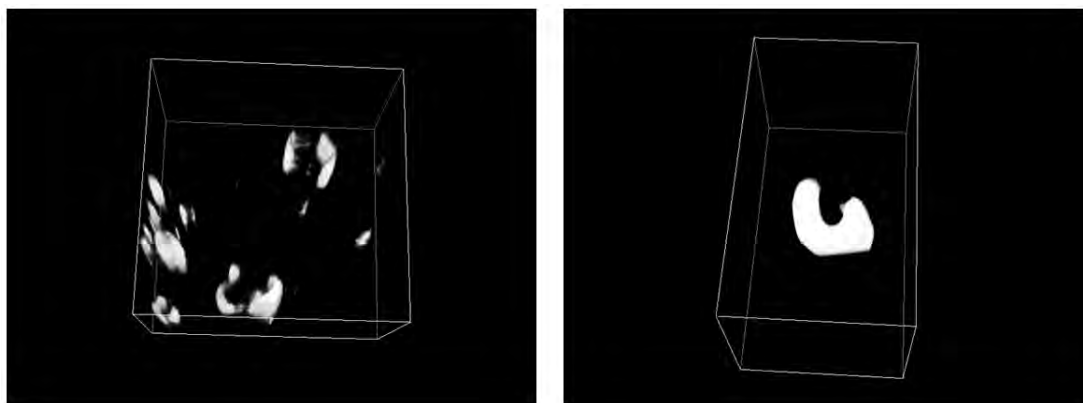


Figura 44. Inclusión fluida en tres dimensiones

Las inclusiones, son metaestables, es decir, pueden moverse a lo largo del tiempo, por lo que puede ser necesario sacrificar resolución para que el barrido en el eje Z sea lo más rápido posible y evitar que puedan producirse variaciones en la inclusión.

6.3.2 Polímeros multicapa

FILM MULTICAPA

Hasta ahora, para conocer el número de capas y la distancia entre ellas en un film multicapa el método más habitual era cortar el material transversalmente, tras haber sido embutido previamente entre dos láminas de algún polímero rígido que facilite su manipulación, y observar dicho corte por microscopía óptica, empleando diferentes técnicas de contraste (por ejemplo, polarización), de forma que llegue a ser posible distinguir entre cada una de las capas componentes e incluso medir sus grosores.

Los polímeros multicapa estudiados, no presentaban fluorescencia, por lo que los estudios se realizan con luz reflejada y basándose en las variaciones de índice de refracción.

Una de las ventajas, ya comentada anteriormente, de este equipo, es que no precisa ningún tipo de manipulación de la muestra, es decir, para ver las capas, no sería necesario cortar la muestra y observar su corte, sino que el equipo es capaz de penetrar en el plano XZ de la muestra, devolviendo la imagen de un corte en el monitor.

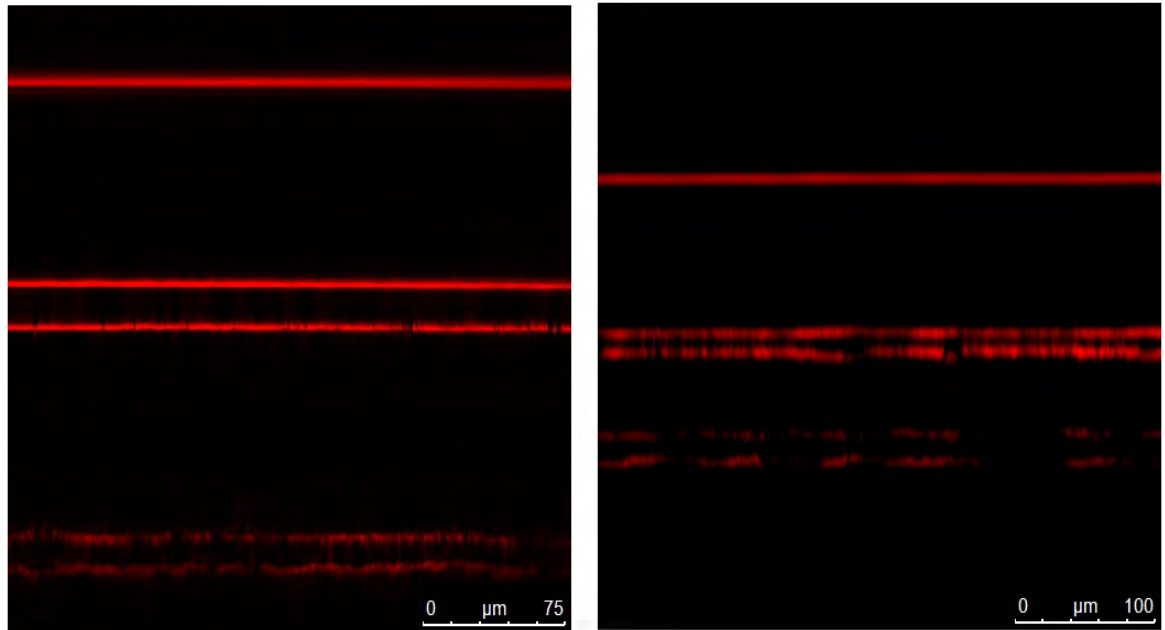


Figura 45. Imágenes de cortes en plano YZ de polímeros multicapa.

Cada línea que se muestra en la figura 45, se corresponde con un cambio de índice de refracción. Las primeras líneas que aparecen, son más uniformes, siendo éstas debidas a los cambios de índice de refracción del vidrio del cubreobjetos, con el aire y con el polímero (es decir la distancia entre ellas proporciona el espesor del cubreobjetos). En algunos casos, aparece una tercera línea muy cercana a la segunda, que puede deberse a una capa de aire que haya quedado durante el montaje de la muestra.

Las capas de polímero son menos uniformes debido a las imperfecciones que presenta este material y en muchos casos menos nítidas, ya que el índice de refracción de los polímeros varía entre 1,4 y 1,6, estando en muchos de ellos la variación en la segunda o tercera cifra decimal, lo que hace imposible para el equipo ser capaz de distinguir entre capas con índice de refracción tan cercano.

Por otra parte, el haz de luz llega perpendicular a la muestra, pero al hallar una interfase en la que cambia el índice de refracción, el haz se desvía ligeramente, dejando de ser perfectamente perpendicular. Por este motivo, la distancia entre capas que nos proporciona el equipo debe corregirse, dividiendo el resultado que proporcione, entre el valor del índice de refracción de cada medio que el haz vaya atravesando.

GRANZA

Las muestras estudiadas, en este caso, eran granza de un adhesivo sensible a la presión (PSA), basado principalmente en etilvinilacetato (EVA) y resina de colofonia. La superficie está recubierta con ceras de polietileno (PE) y de bis-estereamida de etileno (agente de dispersión, EBS), para evitar que se pegue la granza entre sí.

El objetivo es poder visualizar el recubrimiento para conocer su espesor, y si se ha extendido de forma uniforme. La importancia del recubrimiento radica, en que es esencial para evitar que el producto se pegue entre sí cuando sea dosificado al extrusor de film.

Los polímeros citados anteriormente, no presentan ningún tipo de fluorescencia, por lo que las imágenes se toman con luz reflejada. A continuación, en la figura 46 se puede observar la forma y el espesor de este recubrimiento.

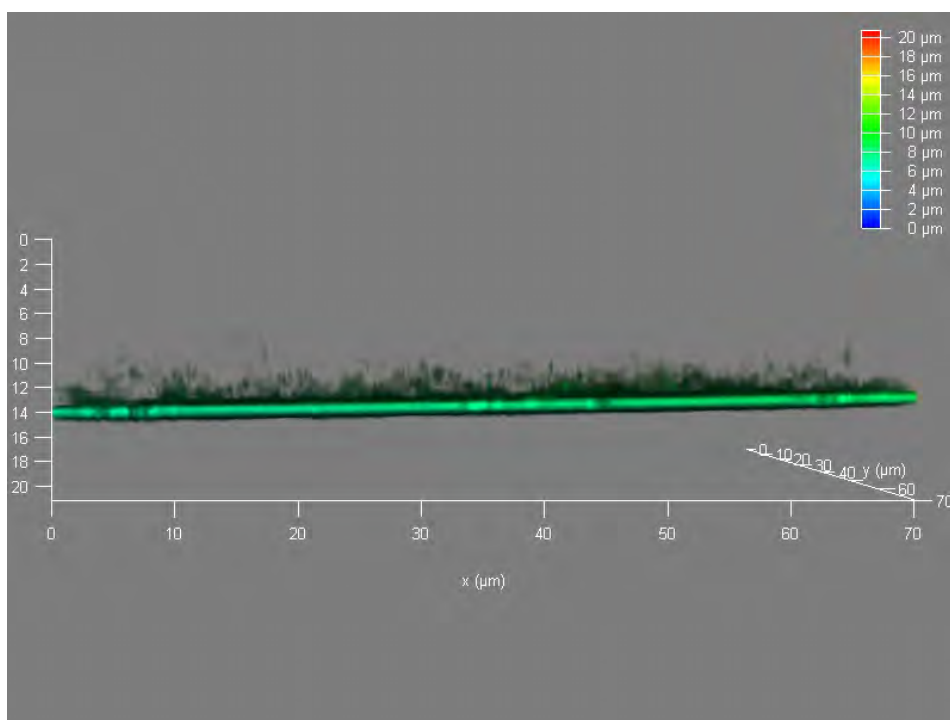


Figura 46. Vista del recubrimiento realizado a un polímero

Gracias a este método, es posible observar como está el recubrimiento repartido en la superficie, y medir su espesor, sin necesidad de cortar la granza y que se pueda producir una distorsión en los resultados.

6.3.3 Otras aplicaciones con el TCS-SP8

COMPOSICIÓN DE COMBUSTIBLES

El análisis se realizó sobre un aditivo que contenía nanopartículas de cerio, para intentar observar la distribución, cantidad, y tamaño de éstas.

Utilizando luz reflejada, es posible observar partículas en suspensión. Dado que el TCS-SP8 no es capaz de proporcionar la composición de dichas partículas, se utiliza también la técnica de fluorescencia de rayos X para confirmar que se trataba de cerio.

La observación de la muestra de aditivo sin ningún tipo de modificación (tipo secado, necesario en otros análisis) permite detectar nanopartículas y aglomerados de éstas, con tamaños que oscilan entre unos 100 nm y 1 μ m (Figura 47).

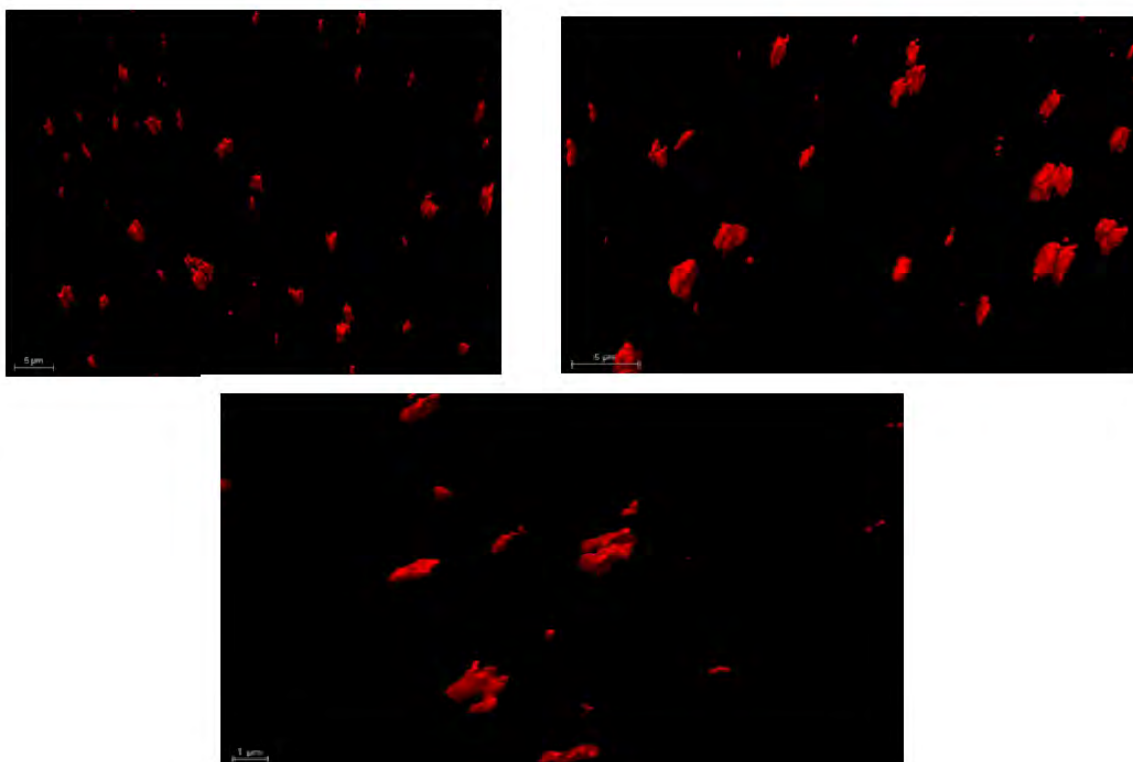


Figura 47. Imágenes de las nanopartículas tomadas con microscopía confocal por reflexión.

PAPEL

La observación de las fibras de papel en este equipo, no presenta mucha dificultad, ya que éstas presentan fluorescencia intrínseca. La figura 48 muestra la distribución de las fibras en una muestra de papel.

Estas imágenes han sido recogidas utilizando dos detectores simultáneamente, para poder recoger dos tipos de fluorescencia (uno se muestra en verde y otro en rojo).

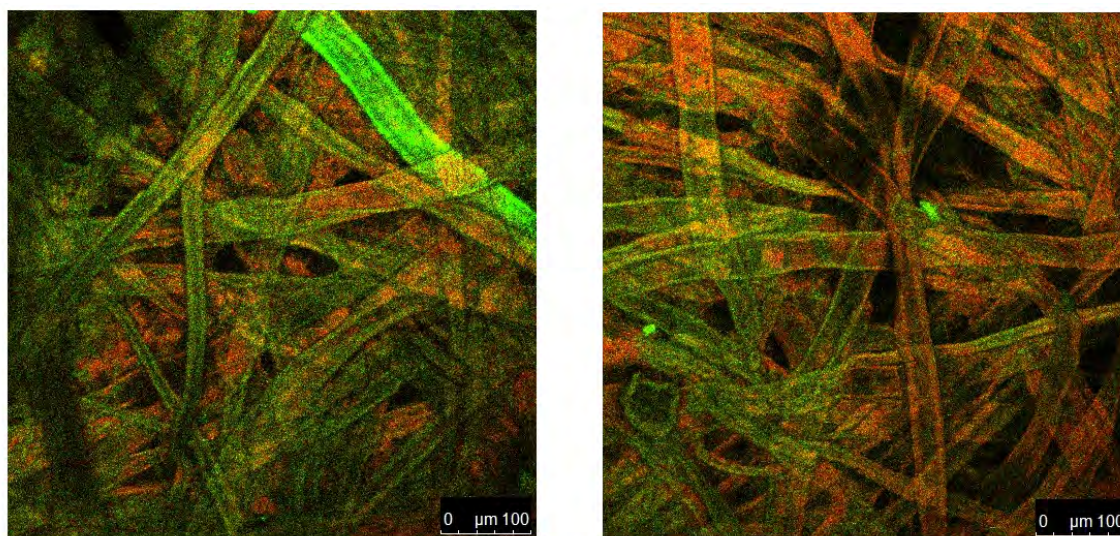


Figura 48. Imágenes de la fluorescencia de las fibras de papel.

Capítulo 7

Conclusiones

El objetivo de este proyecto, consiste en instalar y poner a punto dos equipos de microscopia confocal (DCM 3D y TCS-SP8) para poder cubrir con ellos las necesidades de las diferentes áreas del Centro Tecnológico de Repsol.

Es importante destacar que aunque los equipos de microscopía confocal, son muy utilizados en algunas ramas de la ciencia, como la Biología y la Medicina, en el campo de la Tecnología de Materiales aún son relativamente escasas sus aplicaciones.

Las conclusiones tras los trabajos que se han realizando a lo largo de los nueve meses de desarrollo de este proyecto fueron:

1. Se ha comprobado que los equipos DCM 3D y TCS-SP8 son complementarios uno del otro y de gran utilidad para resolver las necesidades previstas.

El DCM 3D está enfocado a la visualización y análisis de las superficies de diferentes materiales, siendo capaz de proporcionar parámetros de rugosidad, isotropía, porosidad, espesores, volúmenes, etc.

Por su parte el TCS-SP8 es un equipo orientado a la detección de fluorescencia de las muestras, o de los fluorocromos con los que se hayan teñido éstas, y también de mostrar secciones transversales de las muestras, sin

que en ellas se haya practicado ningún corte físico, basándose en las diferencias del índice de refracción. A diferencia del DCM 3D, este equipo no proporciona el color real de las superficies de las muestras observadas.

Los dos equipos son confocales, por lo que sólo recogerán la parte de muestra que se encuentre enfocada, realizando un barrido en el eje Z de ésta, para poder devolver una imagen en tres dimensiones.

2. Se han desarrollado varios métodos para el laboratorio de Tecnologías Analíticas, en concreto, “Medición de huellas de ensayo HFRR en rodamientos por microscopía confocal” y “Medición de huellas de cojinetes de biela debidas al efecto de cavitación por microscopía confocal”. Estos métodos se han descrito con anterioridad.
3. Por otra parte he adquirido una visión general del funcionamiento de una multinacional, en la que he tenido la suerte y el placer de trabajar para otros departamentos, como el de motores, intentando en la medida de lo posible satisfacer sus necesidades. Todos los departamentos dependen de los estudios de otras áreas, por lo que los avances de unos siempre son mejoras también para los otros.
4. Por último, he adquirido una experiencia general en el laboratorio de Analítica, especialmente de Estado Sólido.

Capítulo 8

Anexo

8.1 Definiciones básicas

Para un mejor entendimiento del texto, se proporcionan algunas definiciones de conceptos básicos:

- *Píxel*: se denomina píxel a cada uno de los puntos que forman la imagen.
- *Vóxel*: es la unidad cúbica que compone un objeto tridimensional. Constituye la unidad mínima procesable de una matriz tridimensional y por tanto, es el equivalente del píxel en un objeto 3D.
- *Aberraciones*. Las aberraciones son distorsiones de la imagen observada con respecto a la imagen real, originadas por el sistema óptico empleado para la observación, por lo que inevitablemente conllevan a una degradación de la imagen. Ocurren cuando la luz proveniente de un punto de un objeto, no converge hacia (o no diverge desde) un solo punto, después de transmitirse a través del sistema. Los instrumentos precisan corregir estas distorsiones para compensar las aberraciones, ya que producen borrosidad en la imagen. Sin embargo es imposible eliminar por completo todas las aberraciones, además muchos de los componentes

de corrección también pueden introducir aberraciones adicionales. Las principales son:

1. **Aberración Cromática:** la distancia focal de una lente depende del índice de refracción de la sustancia que la forma y de la geometría de sus superficies. Puesto que el índice de refracción de todas las sustancias ópticas varía con la longitud de onda, la distancia focal de una lente es distinta para los diferentes colores. En consecuencia una única lente no forma simplemente una imagen en un objetivo, sino una serie de imágenes a distancias distintas de la lente, una para cada color presente en la luz incidente. Además, como el aumento depende de la distancia focal, estas imágenes tienen tamaños diferentes. La variación de la distancia de la imagen con el índice de refracción se denomina aberración cromática longitudinal y la variación del tamaño de la imagen es la aberración cromática lateral. La luz de longitud de onda más corta (violeta) es más curvada que la luz de longitud de onda más larga (rojo) de forma que la luz violeta llega a un foco más cercano de la lente que la luz roja. El efecto puede reducirse colocando dos lentes juntas. En la práctica, la aberración cromática longitudinal se entiende como el efecto de los bordes coloreados alrededor de un objeto visto a través de una lente, causado porque la lente no desvía todos los colores al mismo foco. La aberración cromática lateral genera una mayor proporción de blanco en la imagen. Los efectos causados son falta de definición de la imagen y una diferencia en el porcentaje de los de los distintos colores. Para compensarlo, las lentes compuestas están hechas con vidrios con propiedades de dispersión diferentes.
2. **Aberración Esférica:** es una distorsión en la imagen por defecto de los espejos y las lentes de un sistema óptico, que hacen que los rayos de luz que inciden paralelamente al eje óptico sean llevados a un foco diferente, en función de la mayor o menor distancia a éste. Afecta de manera diferente a cada longitud de onda. Este efecto es proporcional a la cuarta potencia del diámetro de la lente o espejo e inversamente proporcional al cubo de la longitud focal; por tanto, esta aberración es más intensa cuanto más corta es la longitud focal, como ocurre con los microscopio. Como consecuencia, la nitidez de la imagen se ve afectada. Para compensar la aberración esférica en una lente compuesta se pueden usar geometrías cóncavas o convexas de distintos espesores.

- *Lente objetivo*: Una lente objetivo es la parte del microscopio que recoge la luz proveniente del objeto y forma una imagen real magnificada e invertida en algún plano conveniente. La combinación de lentes en una lente de objetivo depende del tipo de fuente utilizado por el instrumento y el tipo de imagen que se requiere. Hay tres tipos principales de lentes objetivo:
 1. *Acromática*: corrige la aberración cromática (por lo general del rojo al extremo violeta del espectro) y la aberración esférica (normalmente entre el extremo del amarillo al verde del espectro). El tipo más común de lentes acromáticas son las de doblete acromático, compuestas por dos lentes individuales hechas a partir de vidrios con distinta dispersión. Los elementos de la lente están montados uno junto al otro, de forma tal que la aberración cromática de uno se ve contrarrestada por la del otro. Las lentes acromáticas son adecuadas para su uso tanto con luz blanca como con radiación monocromática.
 2. *Semiapocromáticas*: este tipo de lente tiene un alto grado de corrección para la aberración cromática y curvatura de campo. Se hacen típicamente a partir de fluorita (u otros materiales sintéticos) y con un alto contraste y transparencia. Las lentes semiapocromáticas se utilizan en microscopia de interferencia de contraste.
 3. *Apocromáticas*: estas, tienen un mayor grado de corrección de la aberración cromática y esférica que las lentes acromáticas. Las lentes apocromáticas se usan típicamente para fotografía en color y microscopía de fluorescencia.
- *Lente ocular*: es la lente que enfoca la imagen en un detector. Hace la función de “lupa” sobre la imagen que produce la lente objetivo.
- *Magnificación (aumento)*: la magnificación es el grado de amplificación o aumento de tamaño de una imagen y viene dada por la ecuación 2.

$$M = \frac{b}{a} \quad [2]$$

Siendo “a” la distancia entre la lente y el objeto real y “b” la distancia de la lente a la imagen formada.

La longitud focal “f” de la lente viene dada por la ecuación 3.

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{a} + \frac{1}{b} \quad [3]$$

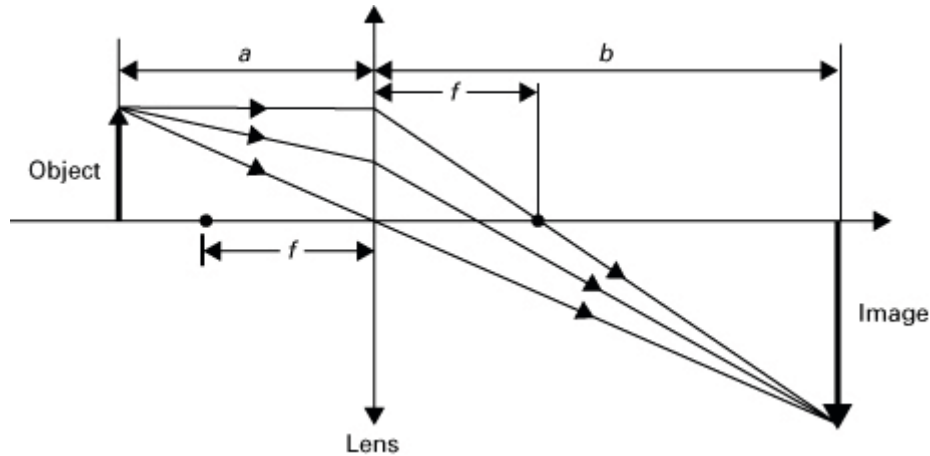


Figura 49. Esquema del funcionamiento de una lente convergente.

(Leach, 2011)

La magnificación (aumento) de un microscopio compuesto viene dada por el producto de la magnificación de la lente objetivo con la de la lente ocular. La magnificación típica de instrumentos usados para medir la textura superficial varía entre 2,5 aumentos y 150 aumentos. En la figura 49 se muestra el funcionamiento de una lente convergente.

Apertura numérica: la apertura numérica o angular determina el ángulo de mayor pendiente que se puede medir, afectando a la resolución óptica. El ángulo de aceptación determinará las pendientes en la superficie que pueden reflejar la luz en la lente objetivo y por lo tanto medirse. La apertura numérica de un objetivo viene dada por la ecuación 4.

$$A_N = n \cdot \text{sen}\alpha \quad [4]$$

Siendo “n” el índice de refracción del medio entre el objetivo y la superficie, y “α” la semiapertura del objetivo.

En microscopía la apertura numérica es importante porque indica el poder de resolución de una lente. El tamaño del detalle más pequeño que puede ser visualizado es proporcional a λ/A_N , donde λ es la longitud de onda empleada. Si aumenta la apertura numérica podremos visualizar más detalles, además las lentes con aperturas numéricas grandes aceptan más luz y dan una imagen más brillante.

- *Poder de resolución (Resolución espacial)*: Cuando se ilumina un objeto, cada punto del objeto observado transmite o refleja las ondas luminosas. Dos puntos próximos del objeto se verán como distintos si la distancia que los separa es grande comparada con la longitud de onda que reciben. Si la distancia que los separa es inferior a la longitud de onda que los ilumina aparecerán a nuestra vista como dos puntos unidos. De nada sirve entonces aumentar el poder amplificador del microscopio. Lo que lograríamos es aumentar de tamaño aparente esa mancha difusa procedente de la unión de los dos puntos, pero sin conseguir verlos separados. Así, el poder de resolución de un instrumento óptico se define como distancia más pequeña entre dos puntos que permite observarlos como entes diferentes.

El poder de resolución de un microscopio por lo general depende del diseño del objetivo. Un objetivo capaz de aprovechar un gran cono de luz procedente de la muestra, tendrá mejor poder de resolución que un objetivo limitado a un cono más pequeño.

Por otra parte, la imagen de un objeto puntiforme no es un punto, sino que, debido al fenómeno de difracción, se corresponde a una pequeña mancha de luz rodeada de aros luminosos. Este fenómeno fue investigado por primera vez por el astrónomo Sir George Airy en 1834, quien demostró que la distribución de la luz de esta forma (conocida por el nombre de disco de Airy) es tal que el radio del primer aro oscuro es una medida de la distancia resoluble en la imagen.

La resolución espacial determina la distancia mínima entre dos elementos laterales que se pueden distinguir en una superficie. Para un sistema óptico perfecto la resolución viene dada por el criterio de Rayleigh (ecuación 5).

$$\varepsilon = 0.61 \frac{\lambda}{A_N} \quad [5]$$

Esta ecuación establece un valor mínimo para la resolución. Si el objetivo no es ópticamente perfecto, o una parte del haz está bloqueado, la resolución disminuye.

La claridad de la imagen crece con el ángulo " α ", que se corresponde al de semiapertura del objetivo.

Se puede aumentar el poder de resolución de un objetivo aumentando el índice de refracción, lo que se consigue trabajando con “objetivos de inmersión” en los cuales se aplica un líquido entre el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo. Otras formas de aumentar el poder de resolución son usando lentes frontales planas que dan un ángulo “ α ” mayor y disminuyendo la longitud de onda de la luz empleada, mediante filtros selectivos. Actualmente, el límite viene prácticamente impuesto por la longitud de onda empleada para iluminar el objeto observado; a éste se le denomina “límite de difracción”, y que corresponde al criterio de Rayleigh (aproximadamente una semilongitud de onda de la radiación).

Por esta razón, a fin de conseguir una alta resolución, se emplean longitudes de onda progresivamente más cortas (en el violeta o incluso el ultravioleta).

- *Campo de visión*: es el diámetro del círculo de la iluminación en la lente objetivo. Cuanto mayor sea el campo de visión menor será la magnificación.
- *Profundidad de campo y profundidad de foco*: la profundidad de campo se entiende como el espacio por delante y por detrás del plano enfocado, eje Z, que puede ser visualizado de forma aceptablemente nítida.

La profundidad de campo “z” viene dada por la ecuación 6.

$$Z = \frac{n \cdot \lambda}{A_N^2} \quad [6]$$

Si la profundidad de campo aumenta, la resolución disminuye.

8.2 Planos del laboratorio de microscopía

A continuación, en las figuras 50, 51 y 52, se presentan los planos de la habitación de microscopía.

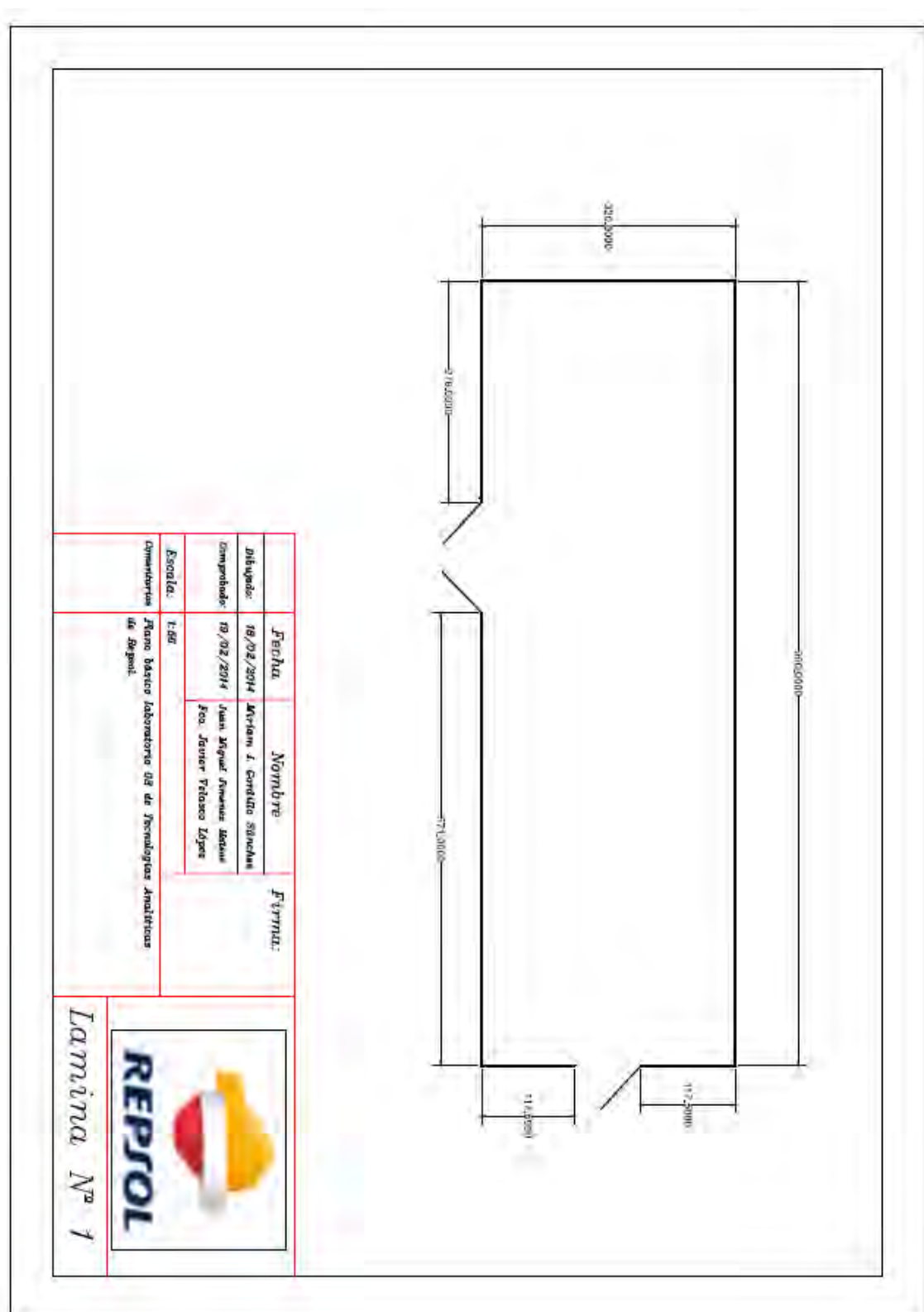


Figura 50. Plano de las medidas generales del laboratorio de microscopía.

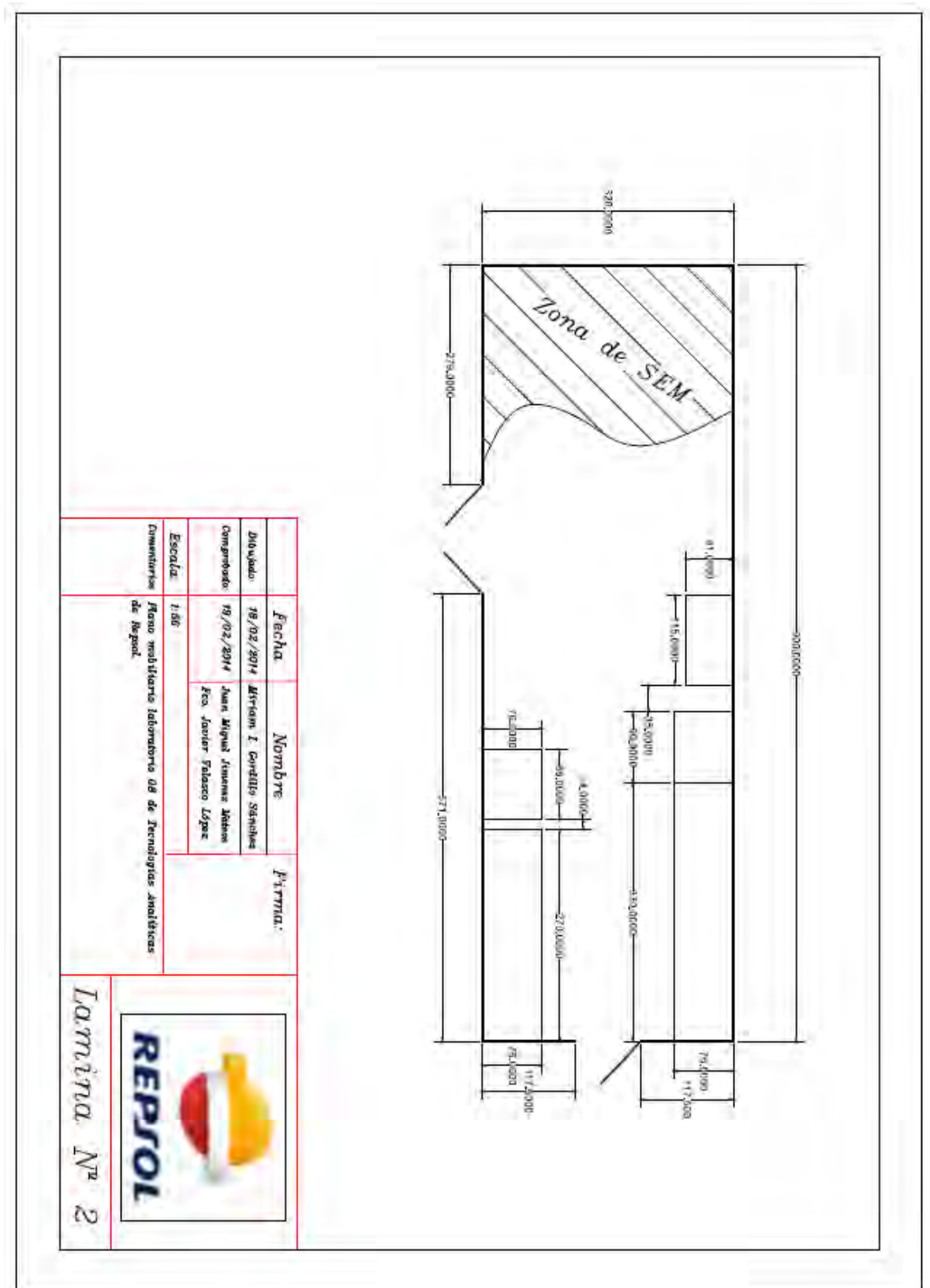


Figura 51. Plano del laboratorio de microscopia, especificando las medidas del mobiliario.

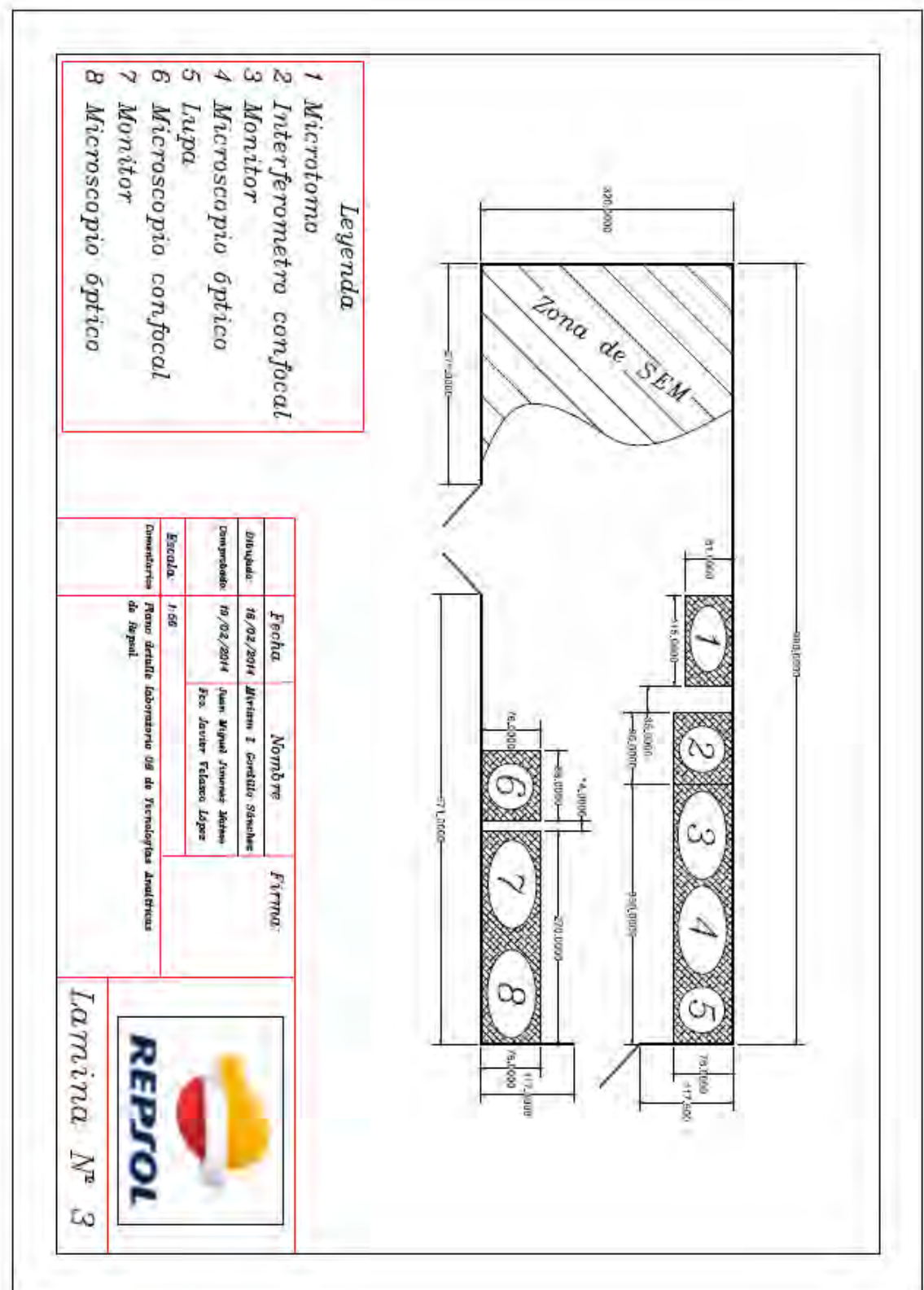


Figura 52. Plano del laboratorio de microscopía especificando la colocación de los equipos disponibles en la sala.

Capítulo 9

Referencias

- (s.f.). Obtenido de www.leica-microsystems.com
- (s.f.). Obtenido de Leica DCM 3D Dual Core 3D Profiler combines Confocal Imaging and Interferometry: www.leica-microsystems.com
- *Descripción del motor y su funcionamiento*. (s.f.). Obtenido de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lim/cleto_o_ja/capitulo3.pdf
- *Desgaste de materiales*. (s.f.). Obtenido de <http://www.utp.edu.co/~dhmesa/pdfs/desgaste.pdf>
- *Inclusión fluida*. (s.f.). Obtenido de http://es.wikipedia.org/wiki/Inclusi%C3%B3n_fluida
- ISO 12156-1. (s.f.). *Diesel fuel- Assessment of lubricity using the high-frequency reciprocating rig (HFRR)* .
- Leach, R. (2011). *Optical Measurement of Surface Topography*. Springer.
- Leica Microsystems. *Leica DCM 3D Condiciones de instalación*.

- Leica Microsystems. *Manual de usuaria DCM 3D*.
- Leica Microsystems. *Manual de usuario Leica Map*.
- Leica-microsystemens. (s.f.). Obtenido de <http://www.leica-microsystems.com/es/productos/microscopios-confocales/leica-tcs-sp8-confocal-configurable/tecnologia/hyd/>
- Leica-microsystems. (s.f.). Obtenido de <http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/leica-tcs-sp8-configurable-confocal/>
- Leica-microsystems. *Leica TCS SP8 Compa con microscopio DMI6000. Condiciones de instalación*.
- Leica-microsystems. *Leica TCS SP8 unidad compacta*.
- Leica-microsystems. *Manual de usuario Leica TCS SP8*.
- *microscopía laser confocal*. (s.f.). Obtenido de <http://conocimientoslaserdiodes.blogspot.com.es/2011/04/microscopia-laser-confocal.html>
- Sanz, V. M. (s.f.). Obtenido de http://www.clipp-project.eu/detalle_noticia.php?no_id=202

Otra Bibliografía consultada

- Li-Piin Sung, Joan Jasmin, Xiaohong Gu, Tinh Nguyen, and Jonathan W.Martin: “Use of Laser Scanning Confocal Microscopy for Characterizing Changes in Film Thickness and Local Surface Morphology of UV-Exposed Polymer Coatings”, JCT Research, vol.1, nº 4, pp. 267-276. (2004).
- D.B.Hovis and A.H.Heuer: “The use of laser scanning confocal microscopy (LSCM) in materials science”, Journal of Microscopy, vol.240, nº 3, pp173-180. (2010).
- Nestor J.Zaluzec: “The Scanning Confocal Electron Microscope”, Microscopy-Today, Vol.6, pp. 8-12. (2003).
- N.Petford and J.A.Miller: “The study of fission track and the other crystalline defects using confocal scanning laser microscopy”, Journal of Microscopy, Vol.170, nº 3, pp. 201-212. (1993).

